

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA VEGETALE

XXIV CICLO

**LA BIODIVERSIDAD DEL OLIVO (*Olea europaea* L.) EN COLOMBIA: ESTUDIO  
MOLECULAR, MORFOLÓGICO Y FENOLÓGICO DEL GERMOPLASMA LOCAL**

LA BIODIVERSITÀ DELL'OLIVO (*Olea europaea* L.) IN COLOMBIA: STUDIO  
MOLECOLARE, MORFOLOGICA E FENOLOGICA

OLIVE (*Olea europaea* L.) BIODIVERSITY IN COLOMBIA: MOLECULAR,  
MORPHOLOGICAL AND PHENOLOGICAL STUDIES ON LOCAL GERMOPLASM

Candidato

José Francisco García Molano

Tutor

Prof. Andrea Fabbri

Coordinador

Prof. Marcello Tomaselli

2012



**A mi familia**

**Esperanza**

**María Fernanda y Adriana**



<b><i>I. OBJETIVO</i></b>	<b><i>1</i></b>
<b><i>II. INTRODUCCIÓN</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b>1. La historia</b>	<b>5</b>
<b>2. Situación actual en la región del alto Ricaurte en Boyacá</b>	<b>8</b>
<b>3. El consumo de aceite en Colombia</b>	<b>8</b>
<b>4. Morfología del olivo</b>	<b>9</b>
4.1. Aparato radical	10
4.2. Tronco	10
4.3. Ramas	10
4.4. Hojas	10
4.5. Inflorescencia	11
4.6. Flores	11
4.7. Fruto	11
4.8. La semilla y el embrión	12
<b>5. Ciclo de desarrollo y fase fenológica</b>	<b>13</b>
5.1. Reposo vegetativo	13
5.2. Inducción floral	14
5.3. Diferenciación floral	14
5.4. Crecimiento del brote	15
5.5. Miñolatura	16
5.6. Floración	16
<b>6. Desarrollo floral y floración</b>	<b>16</b>
6.1. Desarrollo de la flor	16
6.2. Polinización y fecundación	17
6.3. Cuajado y crecimiento del fruto	17
6.4. Maduración	18
<b>7. El olivo en su ambiente de origen</b>	<b>19</b>
<b>8. Fotosíntesis</b>	<b>21</b>
<b>9. Identificación morfológica y molecular</b>	<b>23</b>
9.1. Clasificación varietal	23
9.2. Marcadores genéticos para la identificación varietal	24
9.3. Marcadores bioquímicos (proteínas totales y de reserva e isoenzimas)	25
9.4. Marcadores basados en la PCR (Polymerase Chain Reaction)	25
9.4.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	26
9.4.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	27
9.4.3. SSR (Simple Sequence Repeat)	28
<b><i>III. MATERIALES Y MÉTODOS</i></b>	<b><i>29</i></b>
<b>1. Sitios de estudio</b>	<b>29</b>
<b>2. Caracterización molecular y Análisis Morfológico</b>	<b>30</b>

2.1. Caracterización Molecular	30
2.1.1. Extracción del DNA de las hojas	30
2.1.2. Análisis SSR	32
2.1.3. Amplificación SSR	32
2.1.4. Análisis de los datos SSR	34
2.2. Análisis Morfológico	34
2.2.1. Crecimiento y Desarrollo	36
2.2.2. Relación clima morfología y fenología.	36
2.2.3. Influencia del suelo y comportamiento fenológico	37
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>1. Caracterización molecular</b>	<b>39</b>
<b>2. Análisis Morfológico</b>	<b>47</b>
2.1. Crecimiento de las inflorescencias	47
2.2. Época de floración	51
2.3. Crecimiento de Frutos	57
2.4. Crecimiento de ramas	63
2.5. Condiciones ambientales, crecimiento y desarrollo	68
2.6. Condición edáficas, crecimiento y desarrollo	69
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>77</b>

*Agradecimientos*

# I. OBJETIVO

Colombia no tiene tradición ni experiencia en la producción de olivos a pesar de que estos llegaron desde 1531, y se propagaron en diferentes lugares del país, especialmente en las región Andina, sobre los 2200 m.s.n.m., donde aún se encuentran arboles solitarios, especialmente en los monasterios, conventos y templos, también existen vestigios de cultivos en región del Alto Ricaurte donde es posible encontrar arboles con troncos de más de un metro de diámetro y copa que alcanza hasta los quince metros de altura; además se encuentran algunos huertos con árboles viejos que han sido podados para mantenerlos como plantas ornamentales, de los que han brotado ramas que formaron una copa más densa y de menos altura, de estos se han recogido aceituna, acuerdo con agricultores viejos.

Las condiciones climáticas aparentemente similares de esta región con las del lugar de explotación del olivo pueden haber favorecido el desarrollo por adaptación de los cultivares existentes, pero no han permitido la expresión genética de estas plantas dado que se observan distintas épocas de floración, unas más marcadas que otras, pero en general durante todo el año. Las inflorescencias aparecen en los extremos de los ramos lo que además puede estar ocurriendo por aspectos como un deficiente programa de fertilización y poda inadecuada limitando la cantidad de luz al centro de la copa (Barranco 2008; Fabbri 2010); así mismo el estrés hídrico o nutritivo seis semanas antes de la época de floración reduce el número de flores por inflorescencia e incrementa el aborto ovárico (Gucci et al 2003), porque empieza a manifestarse una característica en el olivo, la competencia por asimilados, que afecta el desarrollo de los órganos florales y a su capacidad fructífera, existiendo una gran variabilidad en la tendencia al aborto pistilar entre variedades (Barranco, 2008).

Del proyecto del gobierno nacional en la década de 1950 para establecer el olivo como cultivo en la región del Alto Ricaurte con variedades importadas, de estas quedaron algunas de las cuales se desconoce su identificación, pero que los agricultores reconocen como Picual, Pasareira y Cordobil, así mismo existen las que denominan Vileyva de tronco verde y Vileyva de tronco amarillo, nombres que dieron por desconocer su identificación pero que morfológicamente las identifican de manera diferente a las tres primeras. Igualmente se registra un material vegetal traído del Perú bajo la denominación de Arbequina, del cual no se conoce cosecha ni la identificación exacta, pero que de todas maneras

muestra una morfología diferente a los arboles existentes en la región, sin embargo este material aún no se ha propagado.

De otra parte debe tenerse en cuenta que en el tiempo en que se desarrolló este proyecto aún no existía una técnica de identificación genética confiable, es posible que desde el lugar de origen las plantas no correspondan a las variedades de acuerdo a la clasificación actual. Sin embargo el material vegetal que existe se ha venido propagando mediante injertos, estacas o pollones, tomando como referencia aquellos arboles de los cuales se conoce que han dado cosecha, producto de esto existen algunos cultivos con plantas de más de 30 años según sus propietarios.

Actualmente se están plantando cultivos nuevos con destino a la producción de olivas para extracción de aceite, registrándose cuatro fincas con aproximadamente 2650 plantas cuyas edades oscilan entre 1 y 4 años, que han comenzado su producción; sin embargo estas plantas muestran un crecimiento natural debido a que no se están realizando podas de formación, por lo que tienen abundante producción de ramas nuevas en las que la planta invierte gran cantidad de su energía, así mismo el tronco es muy delgado y la floración se presenta en las ramas más altas.

Los cultivos de árboles con más de 30 años tampoco tuvieron poda de formación por lo que la copa se muestra con ramas gruesas y largas que no permiten la penetración de la luz al interior de la planta, esto provoca que la floración se presente en ramas nuevas de la parte alta de la copa y ramas de hasta 6 metros de longitud, que reciben mayor cantidad radiación solar, estas ramas por el peso de los frutos y ramas jóvenes las inclina hasta quebrarse, lo que obliga a un corte de donde salen ramas nuevas con buen desarrollo, pero de crecimiento vegetativo solamente por la descompensación en que queda el árbol lo que hace que la distribución de los nutrientes no sea uniforme llegando más al material vegetal nuevo.

De igual manera se han desarrollado labores para recuperar plantaciones muy viejas mediante trabajos de poda de renovación y controles fitosanitarios, esto en algunos huertos pequeños donde además los olivos comparten espacio con plantas de durazno (*Prunus pérsica* L.), Guayaba (*Psidium guajaba*), chirimoya (*Annona cherimola*) frijol (*Phaseolus vulgaris*), cebolla de bulbo (*Allium cepa* L), encontrándose cosecha en alguno de estos.

Teniendo en cuenta que la región donde se encuentran los olivos tiene condiciones atípicas de clima y altura sobre el nivel del mar 2200m en promedio y sabiendo que esta planta se cultiva actualmente en todos los continentes, donde las condiciones le son favorables para obtener producciones de gran rendimiento y calidad, lo que le permite al potencial de consumidores colombianos de aceite y aceitunas acceder a estos productos a precios bajos la primera pregunta que surge al respecto es, cuál es el interés por el cultivo de olivo en Colombia?

El olivo se convierte en una planta de interés científico, económico, ambiental y cultural para la región, teniendo en cuenta que es un árbol rustico que ha tenido buena adaptación, dando la



posibilidad de recuperar los suelos erosionados por el viento y el agua como ha ocurrido donde han sido plantados, allí se ha formado cobertura vegetal que protege el suelo del proceso erosivo. En la actualidad en gran parte de la región se encuentran los terrenos baldíos, donde existe la posibilidad de plantar los olivos, de esta manera se mejora el entorno y se detiene la erosión.

Por otro lado la economía de la región está basada en cultivos transitorios, turismo y alfarería actividades que no ocupan más del 30% de suelo posible de plantar en olivos, en consecuencia el cultivo da la posibilidad de implementar una industria olivarera de pequeña escala como la que existe en algunas regiones del mundo; donde además se asocia con cultivos de vides; de esta manera existe la posibilidad de una nueva actividad económica para los agricultores de minifundio.

Sin embargo no se puede emprender una actividad como esta si no se tiene la suficiente información, en consecuencia desde el punto de vista científico se necesita conocer las razones por las cuales dadas las condiciones de clima aparentemente adversa esta planta llega a ser productiva, saber a qué variedades corresponden los árboles allí plantados, mediante identificación molecular, morfológica y fenológica para conocer si las variedades existentes corresponden a variedades para producción de aceite o aceitunas de mesa.

Conocer su morfología (tamaño, peso y forma de las hojas, tamaño de las inflorescencias, número de flores por inflorescencia, tamaño y forma de los frutos), de esta manera se pueden relacionar con los datos de identificación molecular para determinar si corresponde a la variedad o si por el contrario el ambiente y prácticas de manejo están influyendo en las características morfológicas de los olivos; así por ejemplo algunas estructuras, pueden haber sido modificados en las plantas de olivo que llegaron de Europa a América, algunos investigadores afirman que la posición casi vertical de las hojas de los árboles de olivo en la zona del Alto Ricaurte en Colombia se debe a un mecanismo de adaptación para protegerse mediante los tricomas de la mayor irradiación que reciben a esta altura en el trópico Alto Andino (Taguas, 2010).

Determinar su fenología (crecimiento vegetativo, época de floración, cuajado, cambio de color del fruto) teniendo en cuenta que los árboles florecen por periodos largos de tiempo y que lo hacen en las ramas que crecen el mismo año, es preciso identificar la época de mayor floración, y la relación con respecto a las condiciones ambientales.

La acumulación de horas frío en la región en estudio no corresponde al mismo mecanismo que se da en los hemisferios norte y sur, donde esta ocurre en el invierno, sino que corresponde a una acumulación permanente durante la noche, donde la media anual es de 5,19°C de acuerdo con los datos de la estación climatológica del IDEAM en Villa de Leiva; de la misma manera las temperaturas extremas anuales muestran una media de 26,7, observándose de acuerdo a lo anteriormente dicho que esta variable permitiría un desarrollo del olivo por un adecuado proceso fotosintético. Sin embargo una diferencia importante la constituye el fotoperiodo teniendo en los hemisferios norte y sur este tiene una

variación considerable durante el año con unos valores máximos de hasta 16 y mínimos de 8 horas luz/día, que han determinado los estados fenológicos del árbol, mientras que en la región este muestra una regularidad de 12 horas luz/día casi de manera permanente.

De otra parte, en el olivo existen flores imperfectas que contienen ovario abortado un fenómeno bastante común de esterilidad morfológica, así como flores estaminíferas, que por lo mismo son infructíferas (Barone y Di Marco, 2003), situación no identificada en los cultivares de Boyacá; pero se sabe que las razones de la falta de desarrollo se deben en gran parte a factores genéticos, nutrición deficiente o a la baja eficiencia de las hojas (Tombesi, 2003). El potasio en particular parece tener un efecto positivo en la floración, ya que su aumento intensifica la formación de amino ácidos, que a su vez promueven la formación de AIA oxidasa, que estimula la inducción floral (Gonzales García et al., 1976) así como los niveles de carbohidratos, aumento de ácidos fenólicos y proteínas (Mazuelos et al., 1983).

De la misma manera, se encuentran frutos pequeños de color negro en racimos los cuales pueden provenir de acuerdo con Barranco (2008) a frutos partenocarpicos o zafairones (aborto ovárico); donde la fecundación no es necesaria para su desarrollo, estos problemas de fecundación pueden ser debidos a vientos fuertes y secos, estrés hídrico y problemas nutricionales.

El proyecto es de interés para el botánico porque le da argumentos para la clasificación sistemática

Para el agrónomo porque le proporciona información que le sirve para mejorar las técnicas culturales especialmente podas y nutrición adecuándolas a las condiciones del lugar

Para el técnico en alimentos, porque puede conocer las características de los frutos obtenidos en el trópico e información sobre el uso que puede dar a los mismos: extracción de aceite o mesa aceitunas de mesa.

Para genetista porque esta primera información sobre las variedades de olivos en trópico alto andino se convierte en el punto de partida para buscar las variedades de mejor comportamiento bajo estas condiciones ambientales

Para viverista o propagador de plantas porque a partir de esta información puede propagar el material existente en la zona identificándolo, además debe hacerlo con el que ha demostrado mejor comportamiento.

Para el olivicultor porque puede conocer las características de la planta de acuerdo a la variedad, identificarlas en su cultivar y reorganizar su producción, plantando árboles que sirvan de polinizadores bien sea porque florecen al mismo tiempo o porque tienen polen compatible con las variedades productivas.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. La historia

El olivo originario de la región que va desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Mesopotamia, Palestina y la zona costera de Siria; desde donde se extendió por Anatolia y Egipto hasta llegar a los países Mediterráneos (Lombardo, 2003; Barranco et al 2008). Se cultiva principalmente entre las latitudes 30 y 45° tanto en el hemisferio Norte como en el Sur, en regiones climáticas con verano seco y caluroso (Barranco et al., 2008), y en particular donde las temperaturas invernales no sean inferiores a cero (Bargioni, 2006). Por miles de años ha proporcionado: madera y frutos, de los que se extrae aceite, empleado como fuente de luz, para curar enfermedades, consagrar objetos, honrar ídolos, alimento y preparación de cosméticos; tal vez por esto se les considera al olivo y a su aceite los productos más importantes de toda la civilización que han seguido el paso del tiempo (Ganino 2006). Pero no es claro en qué época se empieza a cultivar (Bargioni, 2006).

Aunque se tiene información de haberse domesticado en el Medio Oriente desde el cuarto milenio a.C. (Fabbri, 2006). La primera mención del olivo (*Olea europaea* L.) se encuentra en el Génesis, cuando Noé deja salir del arca una paloma que luego regresa con un ramo de olivo en el pico; de otra parte para el hebreo esta planta era uno de los dones más preciosos de Dios, símbolo mismo de la alianza, el aceite de oliva servía a la consagración. “Messia” en ebreo que significa junto del Señor (Ganino, 2006).

Del Asia menor el olivo se difunde en toda el área mediterránea, inicialmente por Grecia, Turquía y Palestina; de allí gracias a los Fenicios y Cartagineses pasa a Calabria y Tunes de donde migra a España, Francia meridional, Italia y Norte de África (Ganino, 2006). En Italia aunque se reseña su presencia desde el siglo I d. C., es a partir de los romanos que comienza la historia del olivo en la Italia septentrional; mientras que este no llega a España sino hasta que los griegos y fenicios introducen el cultivo en sus colonias de la península Ibérica unos quinientos años antes de Cristo.

Dos españoles, el franciscano Fray Junípero Serra y José de Gálvez llevaron el cultivo a América del Norte en 1769. En México lo introdujo dos siglos antes (1560) Antonio Ríbero. La planta dio

origen a la que se conoce actualmente como variedad de la Misión, por haberse establecido en la misión franciscana de San Diego (California).

Hasta 1940 esta variedad fue la única conocida en Estados Unidos, pero últimamente se han obtenido nuevas variedades: Manzanillo, Sevillano, Ascolano y Barouni.

De acuerdo con Taylor (2000) citado por Soleri et al., (2010), este cultivo fue introducido por misioneros Españoles al Caribe y centro de México a principios de los años 1500, y luego se dispersaron por América del norte y en menor medida a América del sur, Chile, Argentina y Perú, donde por las condiciones climáticas ha tenido más desarrollo, Chile por ejemplo ha experimentado un notable desarrollo en los últimos años tanto en la incorporación de superficie como en las técnicas de producción. En el año 1992 se registraba su explotación en la zona norte, con la variedad arbequina, pero en los últimos años la olivicultura se ha incrementado, pasando de 106 Ha en 1992 a 583 Ha (Donnoso, 2006). En el 2003 se extendieron los cultivos desde el norte hacia el centro del país valle del río Huasco Región de Atacama y valle de Azapa ubicada a 250msnm (Sotomayor, 2002) y en la actualidad existen 25.000 has dedicadas al cultivo para producción de aceite, reconocido como de buena calidad INIA (2010).

En Argentina a mediados de la década pasada, tenía 16.900 has plantadas con olivares en explotación comercial, de las cuales solo el 40% (8000 has) correspondían a variedades destinadas a la producción de aceite. Con la implementación de la Ley de Diferimientos Impositivos (Ley N° 22.021) se comprometieron inversiones para plantar más de 70.000 has de olivares, de las cuales el 70 % correspondería a variedades aceiteras. Según el censo realizado por la Dirección de Industria Alimentaria, a finales de 2003 ya se habían plantado 31.000 has de olivares modernos con destino a la extracción de aceite. Según la misma fuente, en Catamarca ya se había llegado a las 18.862 has de olivos, seguida por La Rioja con 14.610 has y San Juan con 9.237 has. Las variedades más difundidas en la Provincia de Catamarca según las mismas estadísticas son: Arbequina (7.821 has), Manzanilla (2.575 has), Picual (2.150 has), Frantoio (1.539 has), Coratina (843 has). Siguiéndole en orden decreciente Empeltre, Barnea, Leccino, Changlot y Arauco entre otras (Bravo et al., 2004).

En Brasil, el consumo de aceitunas y aceite de oliva es cubierto con importaciones, con un gasto anual aproximado de 200 millones de dólares, provenientes principalmente de países como Argentina, Perú y Chile, en América del Sur. Parte de lo que se consume en Brasil también es importado de España y Portugal (Mora et al., 2007). A pesar del significativo consumo de aceitunas de mesa y aceite, Brasil aún no posee importantes plantaciones comerciales para abastecer la demanda interna. Para minimizar esta deficiencia, actualmente se están realizando diferentes trabajos de investigación con el objetivo de evaluar variedades de olivo que puedan adaptarse a las condiciones ambientales existentes. Estas investigaciones han sido desarrolladas en distintas regiones, comprendiendo una gran amplitud edafoclimática de Brasil.

Los ambientes donde el recurso genético está siendo probado representan los estados brasileños de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais y ciertos sitios del nordeste semiárido (De Oliveira et al., 2003a; De Oliveira et al., 2003b). Estas experiencias son realizadas independientemente, por diferentes entidades de investigación, donde son evaluadas tanto el éxito de la introducción y el desarrollo posterior de los germoplasmas, sin embargo se observa el uso de un número restringido de variedades de importancia comercial (Mora et al., 2007).

En Perú el cultivo de olivo se hace principalmente para la producción de aceituna de mesa, actualmente cuenta con un área sembrada de 15.000 has en la región de Arequipa provincias de Caravelí, Camaná e Islai. Cuya s exportaciones de aceitunas en diferentes presentaciones alcanzan las 5000 ton al año a países como Brasil, Estados Unidos, Venezuela, Chile, Italia e Israel entre otros (Gutiérrez, 2007).

A Colombia los olivos fueron traídos por los dominicos y laicos españoles desde 1531 a la región de Villa de Leiva, donde hay evidencias de olivos centenarios en la antigua Misión de Santo Ecce Homo; también se tiene conocimiento que en 1875 el español José María Gutiérrez sembró en esta región cinco mil olivos y mil vides (García, 1963).

A finales de los años cincuenta y principios de los sesenta del siglo pasado, el ingeniero agrónomo español Enrique del Campo realizó un estudio técnico con bases científicas en Boyacá, para lo cual trajo variedades de olivo procedentes de Portugal, España e Italia. Durante los años 1961 y 1962 se monitorearon las labores y producciones de varias plantaciones ubicadas en la zona. Se citan por ejemplo, en la finca Pasadena, producciones de 6.1 kg por árbol en el área de la vega y 2,6 kg por árbol en la parte alta. Según los estudios, las variedades que dieron mejores resultados fueron: Picual, Cordovil, Passareira, la identificada por la población local como “Leyva de tronco amarillo” y otra anónima, pero reconocido el árbol como productivo; así mismo la existencia de un patrón adaptado en la zona y conocido como “Leyva de tronco verde oscuro” (Taguas, 2009).

En Colombia se han realizado publicaciones relacionadas con enraizamiento de estacas, microinjerto in vitro combinadas con la aplicación de reguladores de crecimiento (Rache et al., 2008) y algunos estudios para incrementar el cultivo en Boyacá en las regiones de Villa de Leiva, Sáchica, Sutamarchán, Ráquira y Tinjacá; sin embargo cabe destacar que en algunos lugares las plantaciones responden a factores culturales, sociales, económicos (venta de plantas para fines ornamentales). Por tal razón, en el 2006 se sembraron 5.000 ejemplares en Villa de Leiva para recuperar suelos en donde las condiciones climáticas y ecológicas limitan el desarrollo de cultivos comunes del sector.

## 2. Situación actual en la región del alto Ricaurte en Boyacá

De acuerdo con los estudios de Taguas (2009) existen unas 18000 plantas de olivo ubicadas en la región de Alto Ricaurte municipios de Sachica, Leiva y Sutamarchan que ocupan una superficie de 75,8 Ha distribuidas en 15 fincas y cuyas distancias de siembra son diversas, desde 4×5 hasta de 10×10; , donde se encuentran árboles en completo estado de abandono, otros medianamente manejados de los que se obtienen una cosecha insipiente y tres cultivos nuevos de aproximadamente tres años de edad, propagados vegetativamente a partir del material que existe que la zona teniendo como referencia para ello los árboles que ahora o en otra época fueron productivos.

Los cultivos nuevos que ocupan siete hectáreas y suman 2650 árboles de los cuales se ha obtenido una producción de cuatro kilos de aceitunas por árbol, pero estos son manejados sin prácticas de poda ni fertilización adecuada. Los municipios que conforman la región y que tienen las mismas condiciones topográficas, climáticas y de suelo son: Sachica, Villa de Leyva, Sutamarchan, Tinjaca y Raquira, estos tienen un potencial de tierras baldías con posibilidad para el cultivo, con un área de aproximadamente de 369Km<sup>2</sup> es decir 36.900 hectáreas, que en la actualidad están dedicadas un 20% a cultivos transitorios de tomate (*Lycopersicum esculentum*) bajo cubierta plástica, cebolla de bulbo (*Allium cepa*) y arveja (*Pisum sativum*) y un 10% se dedicada a la alfarería.

Los suelos de la región en estudio corresponden a la secuencia litográfica del alto Ricaurte, formación Arcabuco, se componen de areniscas cuarzosas finas a medias, blanco amarillentas, rojizas con intercalaciones de limolitas rojizas y shales rojos, estas se originaron por acumulación en ambientes fluviales subaéreos con influencias salobres marinas de tipo paralítico y litoral. (IGAC 2008).

Boyacá, está situado a 04° 39' 10" y los 07° 03' 17" de latitud norte y los 71° 57' 49" y los 74° 41' 35" de longitud oeste, en el centro oriente de Colombia con una extensión territorial de 23.189 K2, que corresponden al 2,03 % del país. La región del Alto Ricaurte municipios de Villa de Leiva , Sutamarchan, Tinjaca, Sachica y Raquira, se encuentra en el centro del departamento a una altura promedio de 2200 m.s.n.m. , la temperatura promedio es de 18°C, noches frías con 5.7 °C, y días calurosos y secos cuya media de temperatura es de 27°C,. La precipitación promedio de 993 mm, con vientos fuertes en los meses de julio – agosto brillo solar promedio anual 1869 horas, humedad relativa 75% y nubosidad 6 octas de acuerdo a los reportes del Instituto de Meteorología y Adecuación de Tierras IDEAM.

## 3. El consumo de aceite en Colombia

Las estadísticas de importación muestran que los aceites de oliva originarios de España, tienen la mayor participación de mercado en la importaciones totales, con un 84.06% durante el 2005, seguido por Italia con 11.68%, Perú 2.67% y Chile con el 1% de un promedio 3.2 millones de litros anuales

entre el 2004 y 2006 de acuerdo con la oficina económica y comercial de la embajada de España en Bogotá.

Si bien las importaciones hacia el mercado colombiano son aún bajas, US\$ 2.2 millones en promedio, durante los últimos años, hay que tener claro que en buena medida se ha debido a la reevaluación del Euro, aspecto que se ha visto reflejado en el aumento del precio al consumidor. El aceite de oliva ingresa al mercado a través de un importador, por lo general de productos gourmet, quien se ocupa de distribuirlo a través de las cadenas de supermercados, tiendas gourmet y canal institucional. Para el caso de los supermercados, el producto no siempre es el de mejor calidad, encontrándose aceites de orujo de oliva o aceites refinados, inclusive presentaciones en botella de plástico. Esta situación es un indicador que en este canal una variable de relevancia es el precio.

Las exportaciones españolas de aceite de oliva a Colombia durante el año 2006 rondaron los 4,5 millones de dólares, representando un total de 1.155 toneladas. De este modo, España se posiciona como el líder indiscutible del mercado del aceite de oliva en Colombia, con una cuota de mercado cercana al 89% en valor y de 88% en volumen. Seguido por el aceite de oliva italiano con una cuota de mercado del 4,5% (frente al 9% que ostentaba en 2003) sobre el total de las importaciones. Vale la pena destacar que el consumo de aceite de olivas en Colombia ha tenido un aumento gradual desde el año 2001 donde solo se importó 1'375.403 Kg, en el 2002 1'604.349 y actualmente supera los 3.5 millones de Kg.

#### **4. Morfología del olivo**

La revisión de literatura para este estudio se realizó sobre las investigaciones de morfología, fenología y fisiología para el olivo en ambiente mediterráneo.

El árbol de olivo es una planta arbórea siempre verde que puede alcanzar hasta quince metros de altura, con un tronco cuyo radio llega medidas superiores a los cien centímetros, dependiendo de la edad, que puede ser de más de cien años encontrándose reporte de plantas con cerca de 900 años en el sur de Italia, España. Es una de las plantas cultivadas más antiguas, cuyos orígenes como cultivo son de 4000-3000 a.C. en la zona de Palestina. Actualmente el 95% del área mundial cultivada se encuentra en el Mediterráneo (Barranco et al., 2008).

El olivo, pertenece a la familia botánica Oleaceae, que comprende especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. Las plantas de esta familia son mayormente árboles y arbustos. Hay unas 35 especies en el género *Olea*. Incluida la especie *Olea europea* L. única de la familia Oleaceae con fruto comestible (Barranco et al., 2008).

#### **4.1. Aparato radical**

En el olivo se distinguen: raíz principal, conductora, de transición y absorción; diferentes por la edad, grado de suberificación y función. El 20% lo conforman las dos primeras que aseguran el anclaje y la continuidad vascular con el tallo, el 80% restante lo constituyen la porción más fina entre ellos los pelos absorbentes.

La parte más activa para absorber agua y nutrientes corresponde a la porción sub- apical, aumentada por la presencia de cortos pelos radicales que se forman en las células de la epidermis. Las raíces más jóvenes son primero de color blanco perla con un diámetro generalmente inferior a 2mm, y entre 2 y 10cm de largo dependiendo de la condición ambiental; su color cambia con la suberificación.

Otra función de la raíz es la síntesis hormonal (citoquininas, giberelinas, etileno y ácido absísico) y el almacenamiento temporal de sustancias de reserva (almidón, carbohidratos solubles, proteínas y amino ácidos). Estas funciones son importantes en la fisiología de la relación tronco raíz, por ejemplo las giberelinas y citoquininas sintetizadas en los ápices radicales son utilizadas en el control de la actividad vegetal productiva de todo el árbol, mientras que las sustancias de reserva acumuladas son esenciales para el desarrollo de yemas y flores en la primera fase de la actividad vegetativa después del reposo.

#### **4.2. Tronco**

El árbol tiene un crecimiento libre por lo que asume formas muy irregulares con una copa bastante densa formada por varios tallos que tienen origen directamente de la base o tronco, que obra como eje principal de la planta, proviene de un meristemo que se desarrolla erecto y luego se ramifica; su corteza es de color gris verdusco que luego se vuelve gris; su crecimiento irregular le da formas muy particulares con protuberancias de su leño debido al permanente actividad de crecimiento lateral.

#### **4.3. Ramas**

La estructura de la copa en el olivo es muy articulada y convencionalmente distribuida en ramas de primero, segundo y tercer orden. La rama principal y el tronco constituyen la estructura permanente del árbol, las ramas secundarias de menor diámetro pueden ser permanentes porque soportan las ramas terciarias donde está la fructificación.

#### **4.4. Hojas**

Son de tipo simple y persistente, pudiendo permanecer hasta tres años en la planta; presenta consistencia coriácea, margen entero, y forma elíptica o lanceolada. El color en el haz es verde oscuro,



brillante por la presencia de cera y con tendencia al gris opaco; mientras que por el envés son color blanco plata, recubierto de tricomas, que le sirven para controlar la pérdida de agua por los estomas, así como de filtros de luz. El limbo es plano y termina en micrón, la curvatura del limbo puede generar hojas hiponásticas o epinásticas según la posición que estas tomen. El largo varía entre 30 y 80mm, el área foliar puede oscilar entre 2-3 cm<sup>2</sup> y un máximo de 7 – 10 cm<sup>2</sup> (Barone et al., 1993; Cimato et al., 1997). La nervadura central es muy marcada y las secundarias poco aparentes. El peciolo es muy corto, llegando apenas a medio centímetro de longitud. En general las dimensiones pueden variar dependiendo del cultivar, edad de la planta, vigor del ramo, momento de desarrollo.

Las hojas del olivo presentan un elevado peso seco por unidad de superficie y por unidad de volumen, a causa de: mesofilo compacto, abundancia de elementos esclerenquimáticos y del contenido de agua relativamente bajo respecto a otras especies (Gucci, 2003). Los tricomas están presentes en el haz de las hojas jóvenes y contienen flavonoides y fenoles con los cuales filtra los rayos (UV), mientras que en las hojas adultas lo hace la cutícula y las células de la epidermis.

#### **4.5. Inflorescencia**

Llamada miñola, es de color verde y luego blanca por la presencia de los pétalos, tiene un eje central (raquis) con diversas ramificaciones donde se ubican varias flores, puede medir de 10 a 70mm y contener entre 10 y 40 flores, sin embargo las inflorescencias insertas en los extremos proximal y distal del ramo son de dimensiones más pequeñas (Lavee 1996). El desarrollo de la inflorescencia, dura de 30 a 45 días y está influenciado por factores ambientales y nutricionales (Tombesi, 1995).

#### **4.6. Flores**

Son de color blanco amarillento, con un cáliz, formado de cuatro sépalos reunidos en forma de copa, de tipo persistente, manteniéndose unidos a la base del ovario después de la caída de la corola, cuyo color varía del blancuzco al amarillento. El gineceo constituido por un ovario súpero bicarpelar y bilocular con estilo corto y estigma bifido, una pared inclinada y células alargadas para conservar el polen, la forma del estigma es muy variable distinto en cada cultivar. El androceo está constituido de dos estambres cortos y opuestos que sostienen dos anteras amarillas de gran dimensión, dehiscentes longitudinalmente cuando maduran.

#### **4.7. Fruto**

Es una drupa de forma elipsoidal a globosa, mide entre 1 y 4cm de longitud y de 0,6 a 2cm de diámetro. En madurez es negra, negro violáceo o rojizo, antes de este color siempre es verde. Es un

fruto con una sola semilla compuesto por tres tejidos principales: endocarpo, mesocarpo y exocarpo, el conjunto de estos tres tejidos se denomina pericarpo y tiene su origen en la pared del ovario. Los tejidos del fruto se desarrollan del ovario por los procesos de división, expansión y diferenciación celular, a partir de la fecundación y del cuajado inicial (Barranco 2008).

El endocarpo o hueso empieza a crecer a partir de la fecundación y aumenta en tamaño durante los dos meses siguientes. En su estado maduro está compuesto por células esclerificadas. Estas deben su dureza a la deposición de una gran pared secundaria con un alto contenido de lignina. En el ovario en floración existe un anillo de haces vasculares marcando la separación entre el endocarpo y el mesocarpo. Con la conversión del ovario en fruto, los haces vasculares aumentan de tamaño y desarrollan muchas conexiones entre sí con el fin de importar agua y sustancias para formar el fruto. Los surcos que aparecen en el hueso del fruto maduro se forman alrededor de los haces y son característicos de cada cultivar.

El mesocarpo es el tejido carnoso, que empieza a desarrollarse a partir de la fecundación y crece hasta la maduración. Sus células son parenquimáticas con una gran capacidad de crecimiento, son isodiamétricas y forman una malla bastante compacta. Durante el desarrollo del mesocarpo las células parenquimáticas aumentan en tamaño y, simultáneamente, la formación de notables espacios intercelulares. El almacenamiento de aceite ocurre en las vacuolas de las células parenquimáticas del mesocarpo (Barranco 2008).

El exocarpo o epicarpo es la capa exterior y más fina del fruto que está fuertemente soldada al mesocarpo. Es un tejido compuesto por la epidermis monoestratificada con su cutícula. En el estado inicial de desarrollo del fruto el tejido contiene estomas que permiten una cierta actividad fotosintética de parte del mismo fruto (Tombesi, 1994) que luego se convierten en lenticelas en el fruto maduro, que pueden resultar más o menos visibles en función de la variedad o del grado de maduración. El número, tamaño y disposición se utilizan en el reconocimiento del cultivar.

#### ***4.8. La semilla y el embrión***

Esta se deriva del desarrollo de uno de los óvulos del ovario, está formada de un tegumento externo del endospermo, que deriva de la unión del segundo núcleo del polen con el núcleo polar del saco embrionario que se desarrolla del cigoto. El embrión completa su desarrollo cinco meses después de la floración, ocupa gran parte del volumen de la semilla, presenta cotiledones grandes radícula y plúmula corta (Rapaport, 1998), está situada en el extremo inferior del eje embrionario y corresponde al sistema radical. Entre los cotiledones hay una plúmula pequeña, el órgano de donde se desarrolla el tallo (Barranco et al., 2008).

El endospermo rico en almidón, rodea y alimenta el saco embrionario consumiéndose rápidamente mientras que este último completa su desarrollo (Barone y Di Marco, 2003). A los cinco meses el embrión está completamente formado y es capaz de germinar, sin embargo en los últimos meses de maduración del fruto ocurren cambios fisiológicos en la semilla que inducen su latencia (Barranco et al., 2008).

## **5. Ciclo de desarrollo y fase fenológica**

### ***5.1. Reposo vegetativo***

Esta fase puede ser definida como una suspensión o reducción de la actividad de los órganos vegetativos; en especies siempre verde como el olivo la identificación del reposo es compleja; la presencia de un reposo de la actividad vegetativa, en efecto está estrechamente ligada con las condiciones ambientales, régimen térmico e hídrico que puede inducir una suspensión del desarrollo incluso en el verano. Pero estas especies muestran actividad incluso en el verano, aunque reducida, pero que contribuye con las actividades fisiológicas predominantes: fotosíntesis, transpiración y respiración, en la medida en que las condiciones ambientales le sean favorables (Deidda et al 2003). Sarvas 1974 citado por Mormeneo separa la dormancia en dos periodos: “rest” (descanso) y “quiescence” (dormancia), definiendo el primero cuando las yemas están inactivas debido a las condiciones fisiológicas; y la segunda cuando las mismas permanecen inactivas debido a las condiciones ambientales desfavorables.

Se reconocen tres causas o formas de latencia: paralatencia ocasionada por la presencia de otras estructuras que inhiben el crecimiento de la yema; endolatencia o reposo, que consiste en la incapacidad de la propia estructura para crecer aunque las condiciones ambientales le sean favorables y ecolatencia o quiescencia debida a condiciones ambientales desfavorables. Al respecto Dos santos Ramos (2000) estudio la morfología de las yemas y la brotación en ramos con hojas y defoliados que procedían de árboles de cosechas abundantes o escasas, colocados en condiciones favorables a la brotación (20-22°C), encontrando que las yemas de los arboles con buena cosecha tienden a crecer durante el otoño, mientras que en arboles con poca producción la brotación se establece progresivamente es decir ocurre endolatencia; de otra parte ocurre paralatencia durante el invierno en las yemas de los árboles en carga inhibidas por las hojas y parecen no necesitar frio para brotar vegetativamente, mientras que las yemas de los arboles con poca producción experimentan además un periodo de reposo, endolatencia, que requiere una fase de acumulación de frio para su brotación, que es reproductora. Son las conocidas necesidades de frio en otras especies frutales.

## **5.2. Inducción floral**

Es el proceso por el cual las yemas experimentan cambios fisiológicos que conducen a la formación de yemas de flor. En las axilas de las hojas se forman consecutivamente las yemas que completan su crecimiento y desarrollo en las seis semanas siguientes al inicio de su formación, desde que se localiza en el ramo portador, a partir de ese momento la morfología de la yema no se modifica hasta el comienzo de su brotación en la primavera siguiente, permaneciendo latente con independencia de la causa que lo determine (Rubio et al., 2007). El destino de cada yema, floral o vegetativo, es decir la inducción floral o ausencia, depende de los estímulos que ésta recibe antes de completar su desarrollo como: defoliación escalonada intensidad de la luz, eliminación de frutos, suministro de sustancias hormonales y nutritivas. (Tombesi, 2003; Barranco et al., 2008).

La reducción de luz en la copa durante el año anterior a la floración, lleva a que no se presente diferenciación floral, además por la reducción de la intensidad de la luz, durante la etapa de floración a la del año siguiente, determina una reducción en el cuajado de los frutos y su desarrollo. También el fruto en desarrollo represente un factor inhibitor de la inducción floral, observándose que la eliminación de los frutos de un árbol dentro de las 6-7 semanas posteriores a la floración, incrementan la floración al año siguiente. De otra parte, la aplicación de giberelinas ha demostrado en algunos casos la inhibición de la floración, dependiendo la época de aplicación, sin embargo, es claro que el ácido giberélico y otras sustancias hormonales no tienen una acción directa sobre la inducción floral, pero si actúan sobre la disponibilidad y distribución de los asimilados (Tombesi, 2003). Estudios posteriores muestran un papel relevante de las giberelinas sintetizadas en las semillas de los frutos en desarrollo sobre la inhibición de la inducción floral (Fernandez-Escobar et al., 1992).

Hartmann (1953) demostró que bajas temperaturas en invierno son necesarias para que la planta forme flores, de hecho con temperaturas promedio de 16°C no se encuentra floración. Pero las variedades tienen diferentes exigencias de frío, algunas pueden requerir 600 horas mientras que otras necesitan 1600 a 13°C y en otros casos algunas variedades tienen buen comportamiento con 400 horas a 9°C (Hartmann y Porlingis, 1957).

## **5.3. Diferenciación floral**

Corresponde a la modificación de la condición de una yema tras la inducción floral que se percibe por cambios histoquímicos o morfológicos en el correspondiente meristemo, los cambios morfológicos asociados con la diferenciación floral se distinguen visualmente a partir de finales de febrero, en el hemisferio norte. La formación de las flores se va completando desde mediados de febrero hasta plena floración (Gómez del Campo y Rapaport, 2008).

Según algunos autores, parece ser que hay un periodo (desde octubre hasta febrero) de reversibilidad del proceso, en el que yemas inducidas a flor pueden revertir a vegetativas si no pasan suficiente frío o les faltan azúcares o sustancias elaboradas por las hojas (Tombesi, 2003). Las yemas inducidas a flor precisan pasar frío para salir de la latencia invernal (Rallo y Cuevas, 2004) y continuar con el proceso de diferenciación de las estructuras de flor (Lavee, 1996). Dependiendo de las variedades, las necesidades de frío de las yemas de flor son variables, en contra de lo que sucede con las yemas vegetativas que no necesitan frío para brotar (Rallo y Cuevas, 2004).

Durante la primavera, la inflorescencia comienza a crecer, la dimensión final de la inflorescencia no se alcanza hasta pocos días antes de floración. La diferenciación de las estructuras de la flor se produce del exterior al interior: los sépalos, luego los pétalos, estambres y finalmente el pistilo. Dentro de una inflorescencia, el tiempo transcurrido desde la diferenciación de la primera hasta la última flor no suele ser superior de 1-2 semanas (Lavee et al., 1996). Las 8-10 semanas antes de floración, en las que se forma la inflorescencia y flores, son críticas en el desarrollo de las flores. Según Morettini (1972) son sobre todo de orden nutricional y en particular modo dependen de la relación entre carbono y nitrógeno presentes en la savia por la actividad de las hormonas elaboradas en las hojas.

#### ***5.4. Crecimiento del brote***

Esta fase tiene momentos sucesivos acompañado de modificaciones morfológicas extremas de la yema que se engruesa, se alarga y da origen al nuevo brote; esto tanto en la yema lateral como en la apical y resulta condicionado del ambiente cultural. En condiciones controladas puede ser inducido en cualquier momento del año (Hartmann y Whisler, Lavee). En ambiente Mediterráneo ocurre cerca de la brotación primaveral, una sucesiva emisión de nueva vegetación es seguida en el verano.

La brotación está estrechamente ligada a factores que regulan la variabilidad del régimen térmico y de la geografía de un territorio latitud y altitud. La poda puede determinar aparición de brotes en la época de brotación. Las yemas vegetativas brotan al comienzo de la primavera (final de marzo en el Hemisferio Norte), algo más tarde que las yemas florales. El crecimiento vegetativo de primavera dura hasta la mitad de julio, pero también puede ocurrir entre septiembre y mitad de octubre, este crecimiento se puede afectar por la cosecha presente que acapara la mayor parte de los asimilados (Rallo y Cuevas., 2008).

El estadio correspondiente a la fase de crecimiento del ápice vegetativo, luego del brote, se manifiesta con la aparición y distensión de nuevas hojas, la formación de nódulos y el alargamiento de los entrenudos. La dimensión de la hoja está estrechamente conectada con la época y la duración del periodo de crecimiento del brote. Una vez concluido, el brote inicia a lignificarse en la base, modificando la consistencia del tejido que se endurece y el color de la epidermis se vuelve más intenso.

### **5.5. Miñolatura**

La miñola es el periodo comprendido entre la salida de la inflorescencia y la antesis, comienza y depende de factores climáticos y característica varietal. El inicio de la antesis se encuentra como segundo de las condiciones climáticas y del cultivar. Seguido del inductivo de la diferenciación de la yema, exclusivamente a flores o mixta, se tiene la formación y desarrollo de la inflorescencia. La fase inicia con la emisión de la miñola y la aparición del raquis, luego este se alarga, la bolsa floral inicia a distanciarse y se incha, manteniendo el color verde. Cuando alcanza la dimensión definitiva se observa la separación de la corola, cáliz y pétalos, ahora cerrados que toman una coloración blanca por la pérdida de clorofila.

Las características morfológicas de la inflorescencia como color, dimensión y forma final, número de ramificaciones, número y disposición de flores son características de cada variedad. Estas pueden modificarse de un año a otro, en relación a la variabilidad meteorológica y fisiológica de la planta, así como la posición de la inflorescencia en el brote, por la posición proximal o distal.

### **5.6. Floración**

La antesis comprende diversos estadios de desarrollo que inician con la apertura de la corola, cuando se hace visible el aparato reproductor y se concluye con la caída de estambres y de pétalos, seguido del proceso de fecundación.

El proceso dura pocos días en cada flor, 5 a 6 , pero en la planta puede durar hasta 20 días en función de diversos factores que modifican las condiciones ambientales y la fisiología de la planta. Esta variabilidad determina una antesis escalonada, un anticipo de la floración es provocado por elevadas temperaturas meses anteriores a la antesis, al mismo tiempo que se reduce si este aumento se manifiesta durante la fase.

## **6. Desarrollo floral y floración**

### **6.1. Desarrollo de la flor**

Al inicio de las condiciones climáticas ideales, el eje de la inflorescencia encerrado en el brote comienza a levantarse y alejarse de la bráctea; su eje principal se inserta en los ejes principales y secundarios en las partes intermedias, conjuntas y opuestas.

Las inflorescencias son suficientemente diversas entre varios cultivares y en el mismo cultivar presentando un polimorfismo con prevalencia de la variedad. En el olivo la inflorescencia está en un

racimo y se lleva a cabo sobre el ramo del año anterior, aunque se pueden observar en ramos de dos o tres años. Ocasionalmente se pueden presentar en un brote que termina con una inflorescencia sobre el cual se encuentra la flor normal en cuya axila se insertan otras miñolas pequeñas.

## **6.2. Polinización y fecundación**

En el olivo se requiere polinización cruzada, y el vector para el transporte del polen es el viento, teniendo en cuenta que las plantas florecen abundantemente la producción de polen es suficiente dado que la planta no puede sostener toda las flores y muchas de ellas no son viables, pero cuando se desarrollan sin la polinización sus frutos carecen de semilla por lo que en el olivo se presentan frutos partenocarpicos. La emisión del polen en las flores del olivo se da un día después de la dehiscencia de la antera y termina en 24 a 48 horas, pero dada la escalaridad de las flores dentro de la miñola y en la planta se tiene polen viable hasta 3 o 4 días después de la floración asegurando la llegada de esta a los estigmas receptivos. (Barranco et al., 2008; Tombesi, 2003).

En condiciones de compatibilidad, el grano de polen que llega al estigma germina, comienza la formación del tubo polínico, el cual atraviesa el parénquima estilar hasta llegar al ovario donde entra en uno de los dos lóculos, camina por encima del funículo y llega al micrópilo de un primordio seminal, penetrando por una de las sinérgidas para descargar su contenido de dos gametos. En el proceso de la doble fecundación, característica básica de todas las angiospermas, uno de los dos gametos masculinos procedentes del tubo polínico se une con la ovocélula y el otro con los núcleos polares. De la unión del gameto con la ovocélula se forma el cigoto, que luego se transforma en el embrión. El segundo gameto masculino se une con los núcleos polares para formar el endospermo, tejido que sirve para nutrir al embrión. Como consecuencia de la fecundación uno de los cuatro óvulos (ovulo funcional), empieza su desarrollo como semilla.

## **6.3. Cuajado y crecimiento del fruto**

La fecundación y determinación del ovulo funcional y el desarrollo y crecimiento de éste estimulan el crecimiento del ovario para formar el fruto y determinan el cuajado de este fruto. El cuajado y principio del crecimiento de unos ovarios desencadena el proceso de abscisión de los ovarios no fecundados y algunos fecundados pero menos desarrollados.

El fruto deriva su desarrollo del ovario que crece bajo estímulos hormonales del endosperma de la semilla; el crecimiento inicial es caracterizado de una difusa e intensa multiplicación celular que en cuatro semanas llega a la identificación de tres porciones: exocarpo, mesocarpo y endocarpo. Tiene un crecimiento y aumento de peso fuerte hasta los 45 días después de la floración para detenerse llegando

a los 90 días, pero tiene nuevamente un incremento en el peso que continua por dos meses (Tombesi, 2003).

El fruto tiene un peso fresco que puede variar de uno a diez gramos, al completar la maduración, del 60 -90% de ese peso lo constituye la pulpa, del 10- 40% el hueso y del 1-2% la semilla. Los principales componentes del fruto son: agua, aceite, azúcares, proteínas, taninos, otros derivados y cenizas.

Los lípidos representan del 10-40% de peso fresco y están concentrados en la pulpa, mientras que la semilla tiene 20-28% de grasas. Se encuentran repartidos en: grasas neutras, grasas polares y ácidos grasos libres. En la madurez las grasas neutras representan más de 98% de grasas totales y la mayoría son triglicéridos, solo el 1,1% son diglicéridos. Durante el crecimiento del fruto la cantidad de todos los ácidos grasos aumenta, así el ácido oleico es del 70-80% en la maduración, seguido del ácido palmítico 10-15%, linoleico 5-10% y esteárico 2-3%.

Las grasas polares comprenden fosfolípidos y galactolípidos, el primero contiene ácido oleico y el segundo ácido linoleico. Son lípidos de membrana constituyentes específicos del cloroplasto y de los plastidios del fruto y aumentan con su crecimiento (Marzouk y Cherif, 1981). Los ácidos grasos libres, están en alta cantidad en frutos jóvenes, son metabolizados durante el crecimiento de las olivas y decrecen hasta el 0,15% a la maduración.

La formación del aceite en el fruto, inicia a la generación de la Acetil Coenzima A. Este compuesto deriva de la glicolisis de carbohidratos acumulados en el fruto y suministrados como compuestos de asimilación translocados desde las hojas. La Acetil coenzima A es transformada en Malonil Coenzima A, por medio de la Acetil Coenzima A Carboxilasa, con la intervención de la proteína transportadora y del complejo enzimático de la síntesis de los ácidos grasos.

Los principales azúcares solubles del olivo son la glucosa, la fructosa y el manitol, estos decrecen con el desarrollo del fruto y sus polímeros constituyen la celulosa, hemicelulosa o la pectina y la lignina concentrada en el hueso. Entre los derivados más importantes de los azúcares son: un ester de sacarosa con el ácido oleoeuropeico (ácido monocarboxílico monoterpénico) y la oleoeuropeína que es un complejo  $\beta$ -glucosa; la oleoeuropeína es el polifenol más abundante de la pulpa de la oliva, se acumula durante el crecimiento del fruto y en la maduración se convierte lentamente a glucosidos del ácido elenólico y a la dimetiloleoeuropeína (Amiot et al 1989).

#### **6.4. Maduración**

Es la fase final del crecimiento del fruto, durante la cual la evolución de sus componentes físicos, químicos y organolépticos constituyen un referente necesario para definir el periodo de recolección. Los colores del fruto varían del verde intenso, a violeta rojo oscuros y negros por la



desaparición de la clorofila y la síntesis de carotenoides, flavonoides y antocianinas. El periodo de cambio de color es propio de la variedad influenciado por la carga de frutos y condiciones ambientales (Tombesi, 2003). El periodo de maduración es variable pero en general el cambio de color con algunas excepciones permite establecer los índices de madurez como el propuesto por Ferreira (1979). El tipo de aprovechamiento de la aceituna determina el grado de madurez idóneo para su recolección.

En el olivo ocurren unos cambios fisiológicos y bioquímicos asociados a la maduración, como la presencia de hormonas vegetales que como el etileno ejercen un papel importante en el proceso aumentándose su biosíntesis en este periodo (Barceló et al., 1980). Tanto el ácido abscísico como el giberelico parecen no tener una acción bien definida en el proceso de la maduración; el primero interviene al inicio de la maduración y el segundo al parecer la retrasa y reduce la respiración en el fruto (Vendrell, 1984) y las citoquininas presentan una actividad antisenescente por lo que tienden a oponerse a algunos procesos de la maduración al contrario de lo que ocurre en otros frutales (Shulman y Lavee, 1976; Lavee, 1986).

Dentro de los cambios fisiológicos que experimenta el fruto en la maduración es el descenso en la respiración hasta alcanzar un valor mínimo al final de noviembre, pero luego muestra un incremento llegando a un máximo a mediados de diciembre en el mediterráneo y finalmente desciende coincidiendo con la senescencia. Esta es la fase climatérica que presentan otros frutos.

## **7. El olivo en su ambiente de origen**

Los vegetales son organismos autótrofos que al permanecer en un mismo sitio, se adaptan para soportar las condiciones ambientales que determinan en ellos características fenotípicas, a partir de las cuales se puede obtener mucha información relacionada con la interacción suelo-planta-ambiente.

Según Anderson (1974) citado por Deidda et al., (2003) en un ecosistema definido, los organismos se adaptan a parámetros climáticos conforme a su constitución genética; esto se manifiesta en una serie de respuestas adaptativas con una particular secuencia temporal: la fenología, definida por Lieth (1974) citado por Deidda et al., (2003) como el “Estudio de acontecimientos biológicos que se repiten pudiendo abarcar una sola unidad taxonómica –especie, variedad o clon o extenderse a todo el ecosistema”. En consecuencia, la fenología proporciona datos sobre el ritmo periódico de fenómenos biológicos como floración y fructificación, que dependen de la idiosincrasia propia de la especie y están relacionados con el clima local (Saenz et al., 2003).

Los aspectos de la biología que caracterizan el desarrollo de diversos órganos de la planta se han relacionado con las condiciones ambientales, sobre todo con la temperatura del aire, considerándolo fundamental en la regulación del ciclo reproductivo, en la fase de inducción floral, con particular referencia a los efectos de los niveles térmicos en los procesos de floración.

De otra parte Deidda et al., (2003) afirman, que para el olivo es importante el lugar y distancias de plantación, forma de conducción, manejo de suelo, nutrición mineral, aporte de agua, protección y cosecha; prácticas que deben ser efectuadas teniendo en cuenta la morfología (habito vegetativo, vigor), comportamiento fisiológico (adaptación o sensibilidad a estrés biótico y abiótico) y fenología (crecimiento y desarrollo) de cada variedad, dado que estas condicionan la modalidad y la época de aplicación de las diversas técnicas culturales.

Caruso (1892) citado por Deidda et al., (2003) dice que, el ambiente de cultivación debe ser caracterizado en numerosos sitios de observación, diferentes en latitud y altitud, especificando las sumas térmicas y la temperatura media necesaria para una regular manifestación de cada fase fenológica del cultivo, dando al mismo tiempo indicación sobre la condición ambiental adversa y sus límites geográficos de cultivación. En consecuencia, la temperatura es el principal factor que condiciona la presencia del olivo en un determinado ambiente, y este árbol ha mostrado un crecimiento óptimo entre 20 y 30°C (Rinaldelli y Mancuso 1974 citados por Gucci et al., 2003).

Al respecto, Fabbri y Benelli (2000) postulan la existencia de un requisito mínimo de frío para la inducción de la floración en el olivo; sin embargo, los brotes de hoja se afectan por bajas temperaturas, no obstante la hoja es importante en el proceso de inducción. Los órganos que al recibir el frío inducen el estímulo son las yemas, porque el estímulo tiene un papel en la formación de inflorescencias, no en la inducción. De otra parte la temperatura óptima para la mejor floración parece ser de 10 a 13°C., por debajo de 4°C y superior a 18°C, la exposición debe ser entre siete y diez semanas (Fabbri y Benelli 2000).

El desarrollo de los órganos vegetativos en el olivo se cumple en un año, mientras la actividad reproductiva requiere dos ciclos. El frío influye sobre la producción de inflorescencias y no sobre el crecimiento vegetativo de la yema Hartmann (1953). La fenología de la flor del olivo se caracteriza por un ciclo anual que incluye la formación de yemas en el verano anterior, la dormancia en tiempo frío, el inicio de la brotación terminando el invierno y el desarrollo completo de la estructura floral en primavera; en consecuencia el olivo tiene un ciclo reproductivo de dos años, en el primero se forman yemas que se desarrollan y fructifican en el segundo. Para esto requiere la acumulación de horas frío en el invierno que le permitan inducir la diferenciación de las yemas florales (Hartmann and Porlingis, 1957; Milella y Deidda 1968; Rallo and Martin, 1991; Orlandi et al., 2006) Temperaturas superiores a 6-7°C en enero (reposo) inducen preantesis y aborto ovárico.

Fabbri y Benelli (2000) manifiestan que en zonas templadas, los brotes de las plantas expuestas al frío en enero acumulan inhibidores que están ausentes en plantas no refrigeradas. Lo mismo, que al exponerlas a temperatura de 13°C los inhibidores de la misma estaban presentes en todas las circunstancias favorables a la floración, habiendo acumulación de sustancias como la giberelinas; pero

ellos no explican si estos inhibidores, ácido cinámico y acetil salicílico se sintetizan en las hojas o en las yemas (Badr et al., 1970).

Otros autores (Hartman y Whisler 1975) afirman que el límite mínimo de temperatura es de 2°C y máximo de 12°C para obtener consistente y regular floración. La temperatura influye en el crecimiento de la planta y ellas son las responsables de reacciones bioquímicas y formación de compuestos. Un cambio en tales condiciones altera los productos formados lo que resulta irreversible para la planta.

## 8. Fotosíntesis

Las hojas del olivo asimilan el anhídrido carbónico presente en la atmosfera utilizando la radiación luminosa y convirtiendo esta en energía química mediante un mecanismo fotosintético de tipo C3. La tasa de fotorespiración es elevada y cerca de 10% de carbono fijado se utiliza en la ruta de la glicolisis (Gucci 2003). Diferentes factores afectan la fotosíntesis: radiación, concentración de CO<sub>2</sub>, temperatura, disponibilidad de agua, nutrientes y la superficie foliar bien iluminada.

Solo parte de la radiación luminosa es empleada por una hoja de olivo expuesta a pleno sol, su máxima actividad fotosintética la alcanza cuando se llega al 30% de la intensidad luminosa; esta se mide en intensidad de flujo de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y equivale a 900  $\mu\text{mol}$  de quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Rallo y Cuevas, 2003), este valor es conocido como el punto de saturación.

Las hojas del olivo están recubiertas de tricomas pluricelulares que absorben la radiación comprendida entre 400 y 700 nm, cerca de un máximo del 20% de la región azul del espectro, pero cuya presencia no tiene un efecto sobre la cantidad de (PAR) que llega al sitio de carboxilación en el cloroplasto. Los tricomas absorben hasta el 50% de la radiación ultravioleta (UV) con un pico del 60% a 310 nm, gracias a la acción filtrante de los flavonoides y la composición fenólica (Gucci, 2003); estos son mecanismos de protección adoptados por las hojas del olivo en el Mediterráneo.

El valor de la intensidad de radiación correspondiente se denomina punto de compensación, y en el olivo es de aproximadamente 40  $\mu\text{mol}$  de quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Rallo y Cuevas, 2003). Por debajo de este valor el consumo respiratorio de CO<sub>2</sub> es mayor que la fijación fotosintética.

Las hojas maduras del olivo muestran un equilibrio entre la fotosíntesis y la respiración, alcanzado a nivel del flujo fotónico de la radiación fotosintética incidente (PPF) de 20 a 40  $\mu\text{mol}$  de quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conocido como punto de compensación (Barranco et al., 2008; Gucci, 2003). Por debajo de este valor el consumo respiratorio de CO<sub>2</sub> es mayor que la fijación fotosintética, mientras el máximo valor de eficiencia aparente de conversión de la radiación luminosa ( $\beta$ ) se estima cerca de 0,05  $\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{fotón}$ , en condiciones óptimas de asimilación (Gucci, 2003). La fotosíntesis neta resulta

saturada a valores de PPF superiores a 500-800  $\mu\text{mol fotón m}^2 \text{ s}^{-1}$  porque después de este umbral la asimilación no muestra variación en la intensidad luminosa incidente sobre la hoja (Gucci, 2003).

Únicamente las hojas en la superficie externa del árbol están sometidas a plena radiación solar y esto sólo durante parte del día. En las hojas del interior de la copa la intensidad de radiación puede ser un factor limitante para la fotosíntesis, que afecta negativamente tanto la intensidad de la floración como al número, peso y rendimiento de los frutos allí formados (Barranco et al., 2008).

De otra parte, la temperatura influye sobre todas las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis, especialmente cuando hay altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  limitando principalmente las reacciones bioquímicas que conducen a la transferencia de electrones. En estas condiciones los cambios de temperatura tienen una gran influencia sobre la velocidad de fijación (Taiz y Zeiger 1996). Así mismo la velocidad de respiración aumenta en función de la temperatura estableciendo una interacción entre la foto-respiración y la fotosíntesis, encontrándose que mientras que en las plantas  $\text{C}_4$  el rendimiento cuántico permanece constante en el caso de las  $\text{C}_3$  como el olivo esta disminuye requiriendo más energía para fijar  $\text{CO}_2$ .

A bajas temperaturas la fotosíntesis a menudo limita la disponibilidad de fosfatos en el cloroplasto (Taiz y Zeiger 1996); además una cantidad de fosfato inorgánico es absorbido como energía por la membrana de los cloroplastos, cuando los fosfatos de triosa se envían del cloroplasto al citosol (Lincoln y Zeiger, 2008). Si la velocidad de utilización de la triosa fosfato del citosol disminuye, se inhibe el absorbimiento de fosfato en el cloroplasto y la fotosíntesis se ve limitada por el fosfato (Lincoln y Zeiger, 2008).

La actividad fotosintética comienza con temperaturas de 4 a 5 °C y aumenta gradualmente hasta la óptima de 25 a 26°C (Bargione 2006); sin embargo como se mencionó anteriormente al bajar la temperatura de la óptima disminuye la respiración y la actividad enzimática, así como la absorción de agua y nutrientes, reduciendo la eficiencia fotosintética y los principales procesos celulares que llevan finalmente a detener el crecimiento (Gucci et al., 2003).

De igual manera, al aumentar la temperatura también disminuye la tasa fotosintética y aumenta la de respiración, haciendo inestables los procesos de transporte de electrones ligados a la membrana celular, como por ejemplo el boro, que entreteje las pectinas que componen la estructura de la pared celular para darle fuerza mecánica, dado que se disminuye la porosidad; igualmente se afecta el movimiento del calcio que liga iónicamente los carboxilos formando un complejo sólido con la pectina. (Taiz y Zeiger, 2006).

Para definir las temperaturas óptimas las plantas tienen componentes genéticos importantes (adaptación) y ambientales (aclimatación). Así, plantas de diversas especies que crecen en hábitat con temperaturas diferentes, poseen distintas temperaturas óptimas para la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2008); lo que da como resultado un comportamiento fenológico diferente, Así mismo, el desarrollo de

frutos carnosos como el del olivo, es el resultado de interacciones complejas entre factores genéticos, metabólicos, hormonales y control ambiental que finalmente determinan el tamaño, forma y composición Gucci et al., (2009). Si bien en el crecimiento del fruto se llevan a cabo procesos combinados de división y expansión celular, en el olivo las diferencias en el tamaño del fruto parecen estar relacionadas con el número de células del endocarpo para las distintas variedades (Rapoport et al., 2004b).

Dada la condición siempre verde del olivo, este permite la fotosíntesis en cualquier momento del año en el que no ocurran factores limitantes como: radiación, temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, disponibilidad de agua y nutrientes y la superficie foliar iluminada (Barranco et al., 2008).

Limitaciones a la difusión de CO<sub>2</sub> al sitio de carboxilación en el cloroplasto pueden ser parcialmente superadas mediante el enriquecimiento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera en torno a la hoja. Por otra parte la contaminación por partículas puede ser de importancia en los cultivos, porque estas además de actuar como pantalla para la luz solar, bloquean los estomas y disminuyen la conductancia para CO<sub>2</sub>, interfiriendo simultáneamente con el fotosistema II (Taiz y Zeiger, 1998).

El agua y los nutrientes pueden ser factores limitantes en la fotosíntesis del olivo, el estrés hídrico afecta los procesos fotoquímicos implicados e induce el cierre de estomas. Limitando el ingreso de CO<sub>2</sub> y la transpiración. Tasas de asimilación más bien elevadas (6,5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se midieron en plantas cuyo potencial hídrico al final de la tarde era de cerca de -4MPa, y los valores de la fotosíntesis neta por lo menos el 10% del de una planta bien regada.

## **9. Identificación morfológica y molecular**

### ***9.1. Clasificación varietal***

El olivo es una especie muy rica en variedades, con numerosos sinónimos y homónimos que dificultan la distinción e identificación. En muchos casos se prefiere hablar de cultivar para indicar la presencia de clones dentro de un mismo cultivar, es decir individuos genéticamente heterogéneos que se diferencian por un número más o menos amplio de caracteres. Estos individuos pueden ser ecotipos del mismo cultivar o de diferente cultivar originados por semilla o propagación vegetativa (Bellini et al., 2003).

La difusión de cultivares, hibridación, selección de descendencia y clonación ha originado una gran diversidad de cultivares autóctonos, en todo el mundo. En América es probable que en el inicio del cultivo se utilizara propagación sexual de las primeras variedades introducidas (Barranco et al., 2008).

Los estudios iniciales para la identificación varietal han hecho referencia únicamente a características botánicas, para distinguir la variedad en base a la variación morfológica de la hoja, fruto, endocarpo e inflorescencia. Diferentes trabajos abordan el estudio de las variedades de olivo en el siglo XX. El primer gran impulso se inicia a partir del VII Congreso Internacional de Oleicultura, celebrado en Sevilla España en 1924.

En 1970 se inicia en Córdoba el establecimiento del Banco de Germoplasma Mundial de Olivo. La primera colección de este Banco incorporó las 65 variedades existentes en la Estación de Olivicultura de Jaén. Esta iniciativa desencadenó el comienzo de la Catalogación de las variedades de olivo en España. Los estudios iniciales tenían dos limitaciones: a) confusión entre los conceptos de variedad botánica y cultivar, y b) insuficiencia del método adoptado (Barranco et al 2005).

## ***9.2. Marcadores genéticos para la identificación varietal***

Hasta fecha reciente los marcadores genéticos más utilizados han sido los morfológicos; preferentemente caracteres que, controlados por un solo gen, mostraran un fenotipo constante en diferentes ambientes; pero estos son escasos en olivos y su utilidad está limitada, además, por la elevada frecuencia con la que los genes que los codifican presentan interacciones con otros, así como la influencia sobre su expresión (Zimmerman, 1972)

Otro tipo de marcadores genéticos que están dentro del concepto de marcadores moleculares son los bioquímicos (isoenzimas y otras proteínas) así como los de ADN. Estos últimos son técnicas relativamente sencillas dentro de la biología molecular que identifican diferencias en la secuencia de ADN. Estos además de permitir la identificación de las variedades, incluso en plantas de corta edad y ayudan en la obtención de nuevas variedades por cruzamiento.

Con el término marcadores genéticos viene indicado cualquier carácter hereditario de manera simple, el cual se convierte en un elemento de identificación o de referencia. (Gannino et al., 2006)

El marcador ideal para la identificación de las especies agrarias, debe cumplir con unos requisitos:

- Estable en el tiempo;
- Neutro (ningún efecto sobre el fenotipo);
- Altamente polimórfico (presencia de una alta variabilidad);
- Fácilmente identificables;
- Ser detectados directamente en el ADN;
- Económico.

### ***9.3. Marcadores bioquímicos (proteínas totales y de reserva e isoenzimas)***

El análisis de las proteínas, respecto de otros marcadores bioquímicos ofrece la ventaja de la simplicidad de la técnica de extracción y separación mientras que la información sobre la variabilidad genética es menos exhaustiva. El análisis de la proteína viene utilizada para la identificación de especies y variedades diversas: en particular para el olivo, son estudiadas las proteínas de reserva de la semilla (Durante et al 1992) y la proteína total de las hojas (Petrucelli, 1992).

Las enzimas son proteínas altamente especializadas que catalizan las numerosas reacciones bioquímicas que ocurren en los seres vivos. El término isoenzima fue propuesto por Markert y Moller (1959) para indicar formas moleculares múltiples de una enzima que catalizan la misma reacción bioquímica. La electroforesis isoenzimática permite revelar la variabilidad genética que se produce en muchas proteínas enzimáticas. Las diferencias varietales son evidenciadas a través del polimorfismo enzimático. Porque las secuencias de aminoácidos de las proteínas son determinadas a partir de las secuencias de nucleótidos del gen, el análisis de una estructura proteica, usando electroforesis es una primera aproximación al análisis del gen (Gottlieb, 1977). El polimorfismo isoenzimático resulta un simple marcador para analizar la relación genética en la población (Gottlieb, 1981).

### ***9.4. Marcadores basados en la PCR (Polymerase Chain Reaction)***

La reacción en cadena de la polimerasa ha posibilitado la generación de nuevos marcadores. La ampliación de fragmentos de ADN y la evaluación directa de las diferencias en longitud de los productos amplificados sin necesidad de transferencia a membranas e hibridación han supuesto un cambio cualitativo en las posibilidades de utilización de los marcadores de ADN en Mejora Genética Vegetal (MGV). Las ventajas de obtención de dos fragmentos de ADN son dos: utilizar como cebadores secuencias genómicas conocidas o usar cebadores aleatorios. Estos últimos son los que necesitan menos información previa, y por tanto son de utilidad en aquellas especies en las que, no existan estudio genómicos.

La PCR aprovecha algunas particularidades de la duplicación celular del ADN: de un filamento sencillo de ADN sintetiza uno nuevo, para complementar. Tal complemento viene inducido de una enzima, la ADN-polimerasa, que cumple diversas funciones entre ellas la reparación y la duplicación del ADN. Un notable mejoramiento desde el punto de vista técnico-práctico se ha obtenido con la sustitución del ADN polimerasa de *E. coli* con la producida por la bacteria *Thermos aquaticus*, el cual viviendo en agua a 75°C produce una enzima que se mantiene activa para una serie completa de ciclo de amplificación (Ganino et al., 2006) esto permitió la automatización de la PCR mediante el empleo de termostatos cíclicos, programables a fin de efectuar los ciclos de la PCR a temperatura y tiempo deseado. La cantidad de ADN requerido por la PCR es mínima, basta con una región pequeña de

ADN con doble hélice para iniciar la síntesis. La PCR realiza un ciclo y cada ciclo de amplificación puede redoblar la cantidad de “ADN target”.

El método de amplificación prevé tres etapas fundamentales:

- Desnaturalización (mediante calentamiento), es la separación de la doble hélice que constituyen la molécula de ADN. La temperatura en esta fase está cerca de 94°C durante 5min: en estas condiciones se tiene la activación de la enzima y la desnaturalización del ADN con la formación de filamentos sencillos donde se liga el cebador en los pasos posteriores.
- Hibridación del cebador, bajando la temperatura se une el cebador base par de oligonucleótidos a las secuencias presentes en la molécula de ADN, definiendo el punto de inicio de la síntesis. Elección crítica de esta etapa denominada “annealing” es la determinación de la temperatura de apareamiento, esto es un parámetro variable capaz de determinar la especificidad de la PCR y la producción de moldes de una sola cadena, al cual se liga el cebador permitiendo así la acción de la ADN-polimerasa. Este es uno de los pasos característicos de esta técnica, es decir el hecho que la ADN-polimerasa pueda ser dirigida a sintetizar una región específica de ADN.
- Alargamiento (síntesis de nuevo segmento de ADN), en este paso se alcanzan los 72°C, temperatura óptima para la actividad de la Taq polimerasa. El nuevo filamento de ADN que viene sintetizado a partir de cada primer se extiende hasta la posición de primer filamento opuesto generando en cada filamento de ADN nueva síntesis, nuevo sitio que se pegará al cebador del ciclo sucesivo.

Finalmente la mezcla de reacción se calienta de nuevo, de esta manera se separa el filamento original de aquel de la nueva síntesis, que se vuelve nuevamente disponible para el nuevo ciclo de hibridación con el cebador, síntesis de ADN y separación de filamento. El resultado que se obtiene de la amplificación, al término de un ciclo es una mezcla de reacciones que contienen un número máximo teórico de reacciones de ADN a doble hélice igual a  $2^n$ , tales moléculas son la copia de la secuencia de ADN incluida entre dos cebadores.

#### 9.4.1. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

Los RFLPs eran los marcadores más utilizados antes de la aparición de la técnica de la PCR. Este tipo de marcadores analiza el polimorfismo que viene generado en el ADN después de la digestión con enzimas de restricción. El análisis del polimorfismo de restricción RFLP, es una técnica que permite separar la variación en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN homólogo a una sonda marcada, después de la digestión del mismo ADN con una enzima de restricción. Esta enzima reconoce la secuencia específica del nucleótido, generalmente de cuatro o seis copias de base y cortadas en correspondencia o en cercanía de esta secuencia; los fragmentos así obtenidos son llamados “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP)



Cortando el ADN con enzimas de restricciones diversas, utilizadas individualmente o en combinación, y analizando número y dimensión de los fragmentos resultantes mediante electroforesis sobre gel de agarosa, se puede obtener un mapa de restricción que reporta la disposición de sitios de restricción presentes sobre el ADN original.

Los cambios en la secuencia de fragmentos obtenidos dan testimonio de la posible desaparición o el cambio de algunos genes capaces de provocar una alteración del sitio de restricción. La metodología se basa sobre la técnica Southern blotting. El ADN de la especie en estudio viene digerido y los fragmentos están separados sobre gel de agarosa. Sucesivamente el gel viene inmerso en una solución alcalina para desnaturalizar en hélice sencilla el ADN a doble hélice y luego se procede a transferirlo sobre una membrana de nylon o de nitrocelulosa, que se hibrida con una sonda radioactiva o marcada químicamente. Sobre la sonda se atan los fragmentos de ADN complementarios presentes en las muestras de ADN digerido (que presentan el sitio polimórfico de restricción) el último paso consiste en la exposición a una película radioactiva o marcador inmunológico (marcación química).

La mayor ventaja reside en la codominancia, en la distribución uniforme sobre el genoma, la ausencia de efectos pleiotropicos en la herencia mendeliana (RFLPs genómica) en la herencia materna (RFLPs de los organelos), en la estabilidad hereditaria y en la posibilidad de generar un número casi ilimitado de polimorfismo simplemente variando la combinación sonda-enzima. En el olivo los RFLPs fueron utilizados por primera vez en 1991 (Gallitelli et al., 1991).

#### 9.4.2. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

La técnica utiliza como elemento fundamental la reacción PCR con la finalidad de amplificar específicas regiones del ADN con el auxilio de un único primer de pequeña dimensión (10 a 20 bp). La dimensión reducida de los cebadores hace que este se pueda unir a la zona complementaria del ADN genómico, con alta probabilidad. El número de fragmentos que se pueden obtener depende de dos factores: la secuencia del primer y la dimensión del ADN genómico de la especie en estudio. El fragmento viene separado sobre gel de agarosa, coloreado con etidio bromuro y observando su transluminación a la luz ultravioleta.

Los RADPs gracias al uso de cebadores de pequeñas dimensiones, permiten obtener un elevado número de fragmentos polimórficos (buena capacidad discriminatoria) y el número de primer que pueden ser sintetizados es muy elevado. Además, la rapidez operativa, la baja cantidad de ADN necesaria para el análisis (aunque de escasa pureza), la posibilidad de automatizar y sobre todo el costo relativamente bajo.

En 1995 Fabbri y colaboradores han utilizado el RADP como marcador, identificando 17 cultivares y utilizando la misma cantidad de cebadores.

#### 9.4.3. SSR (*Simple Sequence Repeat*)

Los microsatelites SSR separan las regiones de ADN caracterizada por la repetición de dos o más bases nitrogenadas de la misma secuencia 1-6. La repetición AT es la más frecuente en las plantas. Los microsatelites son difundidos y dispersos en el genoma de la planta, además presentan un elevado nivel de variabilidad al interior de algunas especies; esta característica los convierte en una excelente herramienta para el mapeo de los dos fingerprinting. Se estima en efecto que la frecuencia en el genoma de la planta sea de un SSR cada 50 kb. Inicialmente los análisis de los microsatelites eran basados sobre la técnica RFLP, o sea el ADN venia cortado y luego hibridado con sondas a secuencias repetidas, esto se homologa a la región microsatelite, cebador capaz de reconocer y luego ampliar la región.

Las ventajas de los microsatelites están en su elevada reproducibilidad y en su elevado grado de polimorfismo (la técnica permite en efecto hasta una decena de alelos por locus), y en la actualidad la técnica SSR ha demostrado proporcionar marcadores muy confiables y útiles para la resolución de problemas de identificación varietal y tipificación genética del olivo por cuanto ha demostrado alta transferibilidad y elevado polimorfismo, co- dominanza, aspectos muy interesantes para el olivo (Ganino et al., 2006)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Sitios de estudio

Teniendo en cuenta que los olivos existen en la región del Alto Ricaurte desde hace más de 200 años, del número total de individuos que existen en la actualidad se escogieron 17 árboles con edades superiores a 30 años, que de acuerdo con Cortez (2010) fueron propagados del material proveniente de España, Italia y Portugal; además se seleccionaron 20 plantas de 4 y 3 años que apenas comienzan su producción, las cuales provienen del material que existe en la región. Estas se encuentran distribuidas en cinco fincas como lo indica la (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de árboles por finca

FINCA	MUNICIPIO	EDAD DEL CULTIVO	UNIDADES EXPERIMENTALES	MANEJO DEL CULTIVO	ESTADO ACTUAL
Las acacias (Finca 1)	Sutamarchán	4 años	12	Fertilización, poda, controles fitosanitarios	Fumagina, ácaros
Entre lagos (Finca 2)	Villa de Leiva	3 años	8	Fertilización, poda, controles fitosanitarios	Fumagina, ácaros
La Rioja (Finca 3)	Sutamarchán	Mayor 30 años	8	Fertilización, poda, controles fitosanitarios	Epifitas, líquenes
San José (Finca 6)	Villa de Leiva	Mayor 30 años	8	Fertilización, poda, controles fitosanitarios	Epifitas, líquenes
Aceitunos (Finca 7)	Sachica	Mayor 30 años	1	Fertilización, poda, controles fitosanitarios	Epifitas, líquenes

Los controles fitosanitarios se hacen de la siguiente manera: para Fumagina con productos a base de cobre, Ácaros con ovicidas, Epifitas: (*Tillandsia recurvata*) (*Tillandsia usneoides*) y Líquenes control manual.

La fertilización se realiza con materia orgánica compostada y fertilizantes de síntesis química de la fórmula 15% N, 15% P y 15% K para las aplicaciones no se tienen en cuenta los contenidos que hay en el suelo, ni los requerimientos nutricionales del árbol.

En los árboles jóvenes la poda consiste en la eliminación de la yema apical de la rama central, por esto tienen una altura de 3 a 4 metros, no existe una poda de formación que defina la forma del futuro árbol; la formación que dan a los árboles es cónica, en crecimiento natural; de esta manera en el centro del árbol no penetra luz por que las ramas están concentradas en esa parte de la planta, esto hace que la floración se de en la parte alta de la copa; están injertados sobre patrones conocidos en la región como de la variedad “Leiva de tronco verde oscuro”, en algunos casos el injerto se perdió y fueron reinjertados con el material que estuviera disponible o simplemente se dejó crecer el patrón.

En los árboles de más de 30 años, la poda consiste solamente en un corte de chupones o ramas vegetativas erectas, corte de las puntas de algunas ramas que no tengan flores y corte de ramas enfermas o dañadas; de otra parte la época de poda no tiene una fecha precisa, esta se hace dependiendo el estado del árbol, es decir se intervienen los árboles que no tengan floración.

## **2. Caracterización molecular y Análisis Morfológico**

### ***2.1. Caracterización Molecular***

Para el análisis molecular el muestreo de hojas se hizo teniendo en cuenta los árboles que habían mostrado producción y las denominaciones varietales que tenía el olivicultor. Se recogieron 40 hojas completamente desarrolladas por árbol en ramas de un año, ubicadas a la altura del observador, se empacaron en bolsas plásticas selladas y marcadas para transportar al laboratorio de la Universidad de Parma donde se realizó el análisis molecular mediante marcadores SSR. Una vez en el laboratorio las hojas fueron sometidas a -80°C

#### ***2.1.1. Extracción del DNA de las hojas***

El ADN genómico se extrajo siguiendo la metodología Gounaris et al., (2002), kit Quiagen y CTAB (Belaj et al., 2001). La metodología de Gounaris debe ser modificada por cuanto en el tejido vegetal del olivo son características la presencia de elevadas concentraciones de fenoles, proteínas y carbohidratos.

Un punto crítico del protocolo está en la composición de tampón de extracción; utilizando el tampón de extracción según Gounaris, la cantidad de ADN (capacidad de extracción) obtenida es escasa, luego es modificado teniendo en cuenta dos puntos fundamentales: la fuerza iónica (Tris-HCl) y el poder quelante (EDTA).

Fase de extracción del ADN con el método modificado Gounaris y tampón modificado:

1 gramo de hojas se pulveriza en nitrógeno líquido;

Añadir 7 ml de tampón de extracción;  
 Agitar la solución en Vortex y suspender el material vegetal;  
 Incubar a 65°C por 10 min;  
 Añadir 1,9 ml de Acetato de Potasio 5M;  
 Agitar;  
 Incubar en hielo por 20 min;  
 Centrifugar a 4°C a 4800 xg por 40 min;  
 Transferir el sobrenadante en un nuevo tubo;  
 Añadir al sobrenadante un volumen igual de Isopropanol y la mitad de la solución inicial de Acetato de Amonio (7.5M stock);  
 Dejar a -20°C por 20 min;  
 Centrifugar a 4800 xg por 30 min;  
 Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado-ADN añadiendo un volumen igual de etanol al 75%;  
 Agitar bien y centrifugar a 4800 xg por 15 min. (2 veces)  
 Descartar el sobrenadante;  
 Realizar una breve centrifugación para recolectar y eliminar todo el etanol;  
 Dejar secar el precipitado a temperatura ambiente;  
 Suspender el precipitado en 500 µl de tampón TE (Tab. 2).

*Tabla 2 Solución utilizada para la extracción del ADN*

Acetato de Potasio 5M pH 7.5	Tampón TE:
Acetato de Sodio 3M pH 5.2	10mM Tris-HCl, pH 8.0
Etanol 75% v/v	1mM EDTA pH 8.0
Acetato de Amonio 2M	

El protocolo de extracción ha previsto además, el tratamiento del ADN con la enzima (RNAsi); este proceso ha permitido la completa eliminación del RNA que pudiese interferir durante el proceso de cuantificación del ADN (sobrestimando la cantidad de ADN en la reacción de amplificación).

Una vez ocurrida la reacción enzimática con RNAsi, el ADN es precipitado y luego lavado en etanol, suspendido en al menos 100 µl de tampón TE.

El ADN se cuantifico utilizando el método espectrofotométrico (Spectrophotometer Uvickon 930, Kontron Instruments Inc., Boston, MA, USA), midiendo la absorbancia 260nm. El reporte R=

$OD_{260}/OD_{280}$  considero válido el índice de pureza (calidad) del ADN. En efecto mientras la medida de absorbancia a 260 indica la presencia de ácidos nucleicos, la medida de la absorbancia a 280 indica la presencia de impurezas (sobre todo proteínas). Un valor de R comprendido entre 1.8 y 2 indica una buena pureza del ADN. En este estudio, y para los marcadores utilizados, se consideró aceptable un valor de R comprendido entre 1.6 y 2.

Cuando por espectrofotometría el reporte  $OD_{260}/OD_{280}$  (R) ha resultado bajo, se ha efectuado una purificación con fenol y cloroformo (pH 7.8). esta metodología prevé la extracción de ADN con igual volumen de fenol, luego un pase en vortex y centrifuga, recuperando al terminar esta operación, la fase acuosa; el paso sucesivo ha previsto la extracción del sobrenadante mediante ayuda de igual volumen de una solución fenol-cloroformo (1:1), luego un pase en vortex y centrifuga, y se recupera el sobrenadante; el último pase ha previsto la extracción del sobrenadante mediante ayuda de un volumen igual de cloroformo, luego un pase en vortex y centrifuga, teniendo que recuperar el sobrenadante. Sucesivamente el ADN se ha precipitado con isopropanol y acetato de sodio, luego se lava en etanol al 75% y suspendido en tampón TE.

La cualidad del ADN se ha evaluado inicialmente mediante electroforesis sobre gel de agarosa al 0.8% para estar seguros de haber eliminado todo el ARN y de tener un ADN no degradado. Solo después del test sobre el gel si se hace una nueva cuantificación en el espectrofotómetro. Cuantificado el ADN los estratos se han diluido en tampón TE llevando la concentración del ADN de cada muestra a 20 ng/ $\mu$ l.

### 2.1.2. *Análisis SSR*

Para el análisis SSR han sido considerados (39) muestras obtenidas de hojas de los cultivares de la zona de estudio, identificadas como el olivicultor las conoce, en aquellas de las que no se obtuvo información se le asignó un código. Los árboles fueron elegidos con base a la información de los olivicultores, recogiendo solo material vegetal de aquellos árboles que han dado producción, y de los cuales se ha obtenido el material para los cultivos nuevos.

### 2.1.3. *Amplificación SSR*

Para la amplificación del ADN se han utilizado 10 copias de los cebadores SSR ya utilizadas por otros autores, que han mostrado una buena capacidad discriminante: DCA3, DCA5, DCA9, DCA16, DCA17, (Sefc et al., 2000); UDO18, UDO43, (Marrazzo et al., 2002); GAPU101, GAPU103 y EMO90 (Carriero et al., 2002) (Tab 3).

*Tabla 3 Elenco de los oligonucleotidos utilizados y de las respectivas temperaturas de análisis*

Primer	For 5'→ 3'	Rev 5'→ 3'	Size	T (°C) (annealing)
<b>DCA3</b>	CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC	TGCTTTTGTCTGTGTTGAGATGTTG	250	50
<b>DCA 5</b>	AACAAATCCCATACGAACTGCC	CGTGTGTCTGTGAAGAAAATCG	200	50
<b>DCA 9</b>	AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG	GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	191	55
<b>DCA 16</b>	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG	TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	178	50
<b>DCA 17</b>	GATCAAAATTCTACCAAAAAATATA	TAATTTTTTGGCACGTAGTATTGG	145	50
<b>DCA 18</b>	AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC	GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	183	50
<b>EMO 90</b>	CATCCGGATTTCTTGCTTTT	AGCGAATGTAGCTTTGCATGT	191	55
<b>GAPU101</b>	CATGAAAGGAGGGGGACATA	GGCACTTGTTGTGCAGATTG	264	57
<b>GAPU 103</b>	TGAATTTAACTTTAAACCCACACA	GCATCGCTCGATTTTTATCC	245	57
<b>UDO 43</b>	TCGGCTTTACAACCCATTTC	TGCCAATTATGGGGCTAACT	174	52

La reacción de amplificación se ha efectuado en un volumen de 25 µl que contiene 1x buffer de reacción (International PBI, Milano, IT), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Internatinal PBI, Milano, IT), 0,2 mM dNTPs (American Biosciences), 0,2 µM de cebador (MWG Biotech, Ebersberg), 20 ng de ADN genómico y 0,6 Taq polimerasa (International PBI, Milano, IT).

La reacción de amplificación se optimizo en Thermal cycler MJPC T 100 Research (Watertown, Mass.) programando un primer pase a 95°C por 5 min seguido de 25 o 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura de recorrido específica para cada copia de cebador 45 seg a 72°C respectivamente para la desnaturalización, el recorrido y extensión del cebador, al término del ciclo se han efectuado se han efectuado 8 min de incubación a 72°C.

La elección del número de ciclos en PCR es dada por el tipo de marcador del cebador y de la sensibilidad de secuenciador en la lectura de la fluorescencia. Los cebadores utilizados en el análisis SSR son marcadores con dos fluorescencias, y más precisamente algunos con fluorescencia de emisión de luz azul (CY5) y otros con fluorescencia de emisión de luz verde (IRD700).

La elección de dos tipos de marcadores es debida a la posibilidad de analizar contemporáneamente al secuenciador de dos productos de amplificación obtenidos con cebadores diversos (análisis múltiple). la amplificación con cebador marcado con fluoróforo y emisión de luz verde ha requerido 35 ciclos para obtener un buen resultado.

Los productos de amplificación ha estado separados mediante el uso de secuenciadores CEQ separation Gel Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Inc.). Los perfiles de las bandas han sido analizados por comparación con un marker CEQ DNA Size Standard kit 400 (Beckman Coulter, Inc.).

#### 2.1.4. *Análisis de los datos SSR*

Medida de los alelos: la capacidad discriminante de los microsatélites, como la de otros marcadores moleculares, está ligada a la variación de dimensión de los alelos o de los fragmentos analizados. Esta dimensión viene expresada con número de pares de bases (pb, pares de bases). Cualquier método de análisis sufre de un error experimental que reduce más o menos la precisión estimada de los fragmentos. Los errores experimentales suman una serie de factores de disturbio: la matriz usada para la electroforesis, el tipo y la composición en base del estándar usado de referencia para estimar la dimensión de los alelos o de los fragmentos del ADN en presencia de compuestos que interfieren con la PCR o con la velocidad de migración de productos de PCR en la matriz usada para la electroforesis, error de la polimerasa (slippage, aggiunta di + A ecc.).

Para evitar estos errores es necesaria mucha atención en la lectura de los datos. Es necesario a veces corregir la técnica del binning. Los valores revelados no precisos en absoluto pero vienen atribuidos a intervalos (bins), la longitud varía en función del tipo de microsatélite (di-nucleotidos, tri-nucleotidos etc.), los intervalos de la banda de stuttering, típicos del ejemplo de los SSR di-nucleótidos, de la comparación sistemática de las bandas +1 pb respecto a la banda misma, debido a la unión de la polimerasa de una A a los productos de amplificación etc. El binning permite hacer una lectura “conservativa” de los resultados, lo que implica de una parte perdida de información (ej. Alelos con diferencia de un pb no vienen generalmente considerados diferentes uno del otro) pero evita los falsos positivos, esto es la diferencia ligada al error del método de análisis y estima la dimensión. En la población en estudio se ha usado el software R (R Development Core Team, 2005) para el análisis de binnings.

Elaboración de datos: la biodiversidad de la población en estudio (constituida de 39 plantas de olivo) ha estado valorada en base al número de alelos por locus al interno de la población, a la frecuencia alélica y a la porcentual de heterocigosis ( $H$ ), sea observada ( $H_o$ ) o esperada ( $H_E$ ). En particular, el valor de la heterocigosis esperada ( $H_E$ ) en base al equilibrio de Hardy-Weinberg, es una medida para valorar la variabilidad genética de una población, está la probabilidad que extrayendo casualmente dos alelos de la población estos sean diferentes. Tales valores ha sido obtenidos utilizando el software Identity 1.0 (Wagner e Sefc, 1999). Los datos ha sido elaborados estadísticamente mediante software de análisis estadística GenAlEx 6 (Peakall y Smouse, 2005) para la construcción de la matriz de la distancia genética. El análisis sucesivo ha previsto el uso d los resultados generados por GenAlEx 6 para la construcción de un dendrograma mediante el uso del software Phylip 3.65 (Felsenstein, 2005).

#### 2.2. *Análisis Morfológico*

Para el análisis de esta variable se tuvieron en cuenta las siguientes medidas:



-Caracteres de la hoja: forma, longitud, anchura, curvatura longitudinal de limbo

-Para hacer esta evaluación se tomaron muestras de 40 hojas, adultas de la zona media de ocho a diez brotes del año, elegidos entre los más representativos del árbol la altura del observador; a partir de estas muestras se determinó:

Largo: midiendo desde el pedúnculo al ápice

Ancho: midiendo al centro de la lámina foliar

Forma: determinada de la relación largo (L), ancho (A):

Elíptica ( $L/I \leq 4$ );

Elíptico-lanceolada ( $L/I > 4.6$ )

Lanceolada ( $L/I \geq 6$ ).

Curva longitudinal de la lámina: que corresponde a la torsión de la lámina foliar así:

Epinástica, cuando la curvatura está exponiendo el haz

Hiponástica, la curvatura se da exponiendo el envés

Plana: si la posición es recta

Helicoidal, hay una torsión en la parte media exponiendo el haz y el envés.

Angulo apical, ángulo basal, peso, color del haz, color del envés

Caracteres del fruto: los caracteres para determinar forma, y color en maduración. estas lecturas se hacen semanalmente hasta la madurez del fruto para construir una curva de crecimiento.

Forma determinada en función del promedio entre largo (L) y ancho (l) así:

Esférica ( $L/l \leq 1,25$ ),

Elíptica ( $L/l > 1,25-1,45$ )

Alargada ( $L/l \geq 1,45$ )

Crecimiento de ramas flores y frutos

*Tabla 4 Recolección de datos para análisis fenológico*

ESTRUCTURA A MEDIR	CÓDIGO	UNIDADES
Elongación de rama	1	Milímetros
Número de entrenudos	2	Cantidad
Elongación de la yema de flor o miñola	3	Milímetros
Número de inflorescencias por rama	4	Cantidad
Distancia de la base al ápice en cada inflorescencia	5	Milímetros
Número de flores por inflorescencia: cerradas/ abiertas /caída de pétalos	6	Cerrados/abiertos/Caídos
Número de frutos cuajados por inflorescencia	7	Cantidad
Crecimiento del fruto	8	Milímetros
Cambio de color	9	Porcentaje

### 2.2.1. *Crecimiento y Desarrollo*

De cada planta de las elegidas para el estudio, se escogen 20 ramas del año, de las cuales fueron medidas y contados los entrenudos, como punto de partida, además se marcaron y enumeraron en el sentido de las manecillas del reloj y cada ocho días se tomaron medidas de longitud de la base al ápice. Para el número de entre nudos se cuentan y para la distancia entre ellos se divide la longitud de la rama entre el número.

Teniendo en cuenta que en el momento de iniciar el ensayo existían ramas con inflorescencias, se midieron en estado en que se encontraron al momento de comenzar las mediciones, y luego las que fueron apareciendo, evaluando los ítems mencionados en la (tabla 2), esto permitió tener un referente del comportamiento de las mismas,

Se contaron el número de inflorescencias por rama y de las inflorescencias se midió la longitud de la base al ápice, desde que esta apareció, una vez abrieron las flores se contaron y tomaron los datos, teniendo en cuenta: flores abiertas, cerradas y cuajadas; estas lecturas se hicieron hasta cuando se encontraron frutos cuajados. Las inflorescencias se enumeran en las ramas de la base al ápice.

En la flor la corola se expande y deja ver las anteras de color amarillo brillante, si esta condición es de un 25% de las flores se considera el inicio de la floración. Luego hay un distanciamiento de los pétalos, alargamiento de estambres y de estilo que hacen visible al estigma, en ese momento comienza la dehiscencia de las anteras, cuando esta situación se da en el 50% de las flores se considera plena floración y cuando existe un completo pardeamiento de las anteras y su desprendimiento así como la caída de pétalos y la situación ocurre en un 80% es el final de la floración.

Después de la polinización comienza el engrosamiento del ovario dando lugar al conteo de frutos cuajados por inflorescencia, que fueron contados y medidos semanalmente largos y anchos, estos datos permiten construir una curva de crecimiento en cada genotipo.

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza teniendo en cuenta la normalidad de los datos, con esta información se construyeron las curvas.

### 2.2.2. *Relación clima morfología y fenología.*

Teniendo la información del clima (Temperaturas máximas, mínimas y medias, precipitación promedio anual, velocidad del viento, radiación solar y nubosidad) de los últimos 20 años suministrada por el Instituto de Meteorología y Adecuación de Tierras IDEAM, se establece la relación del comportamiento climático de las variables antes mencionadas con respecto al crecimiento y desarrollo de los árboles escogidos.

### *2.2.3. Influencia del suelo y comportamiento fenológico*

Los análisis de suelos fueron realizados por el laboratorio de diagnóstico en suelos y aguas, de la facultad de Ciencias Agropecuarias- instituto de Investigaciones Agrarias de la Universidad pedagógica y Tecnológica de Colombia para determinar la composición química de los suelos de las diferentes fincas donde están plantados los olivos del presente estudio. Para esto emplean los métodos analíticos (CALS-ICONTEC): pH: relación 1:1, Al (acidez intercambiable): KCl 1N, materia orgánica: walkey-Black, fosforo disponible: Bray II- colorimetría, Ca-Mg-K-Na: Ext  $\text{NH}_4\text{Ac}$ - Absorción Atómica, Fe-Mn-Cu-Zn: Ext DTPA, B: agua caliente, S: fosfato monocálcico, CE: extracto de saturación (conductivímetro), Textura: Bouyoucos.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Caracterización molecular

Las relaciones entre las variedades son estudiadas mediante cluster analysis (UPGMA). A través del análisis estadístico se generó un dendrograma del cual han surgido las diferencias al interno de las poblaciones en estudio. De las 39 muestras los marcadores SSR han identificado 10 genotipos diversos de los cuales un grupo de 23 presentan sinonimia al igual que otro de 7, mientras que solo dos árboles mostraron homonimia.

Del dendrograma (Figura 1) se pueden distinguir dos grupos principales, uno de los cuales (cluster I) es constituido de un único individuo denominado como F6 picual 4 (identificado como genotipo 10), encontrado en la zona de estudio; otro grupo (cluster II) comprende casi la totalidad de la población estudiada.

El cluster II presenta el IIA integrado por los genotipos 8 y 9 y el IIB por los restantes, este a su vez se subdivide en II B 1 que lo integran los genotipos 7, 6, 5 y 4 y el IIB2 conformado por los genotipos 3, 2 y 1.

El (genotipo 1) integrado por las muestras F3 Cordobil 2 y F3 Picual 2 corresponden a árboles de más de 30 años, que son productivos, están ubicados en la vereda Centro Roa del municipio de Sutamarchan; entre tanto el (genotipo 2) corresponde a la planta F7 CG3 hallada en la localidad de Sáchica, de aproximadamente la misma edad de las anteriores, pero de la cual no se conoce producción.

De otra parte, en el grupo de 7 plantas homónimas que conforman el (genotipo 3), se hallaron los árboles de mayor edad en la región, (50 años aproximadamente), denominadas en el estudio como F5O2, F5O1, F5O3, F5O4, cultivo ubicado en Sáchica, estas plantas actualmente no producen, sin embargo han sido propagadas por su historial productivo en otra época. En este grupo también están dos árboles de 3 años F2X1 3 y F2X1 1 que corresponden al olivar de plantas de 3 años de la vereda Monquirá de Villa de Leyva y el árbol de 30 años, F3 picual 3 de la vereda Centro Roa de Sutamarchan.

El grupo con mayor cantidad de individuos (genotipo 4) contiene 7 árboles homónimos de la finca 1 con los códigos F1 Pasareira 4, F1 Pasareira 3, F1 Picual 3, F1 Cordobil 2 y F1 Cordobil 3, F1 Cordobil4, F1 Picual 1, estos son árboles de cuatro años de edad, que iniciaron producción; también se

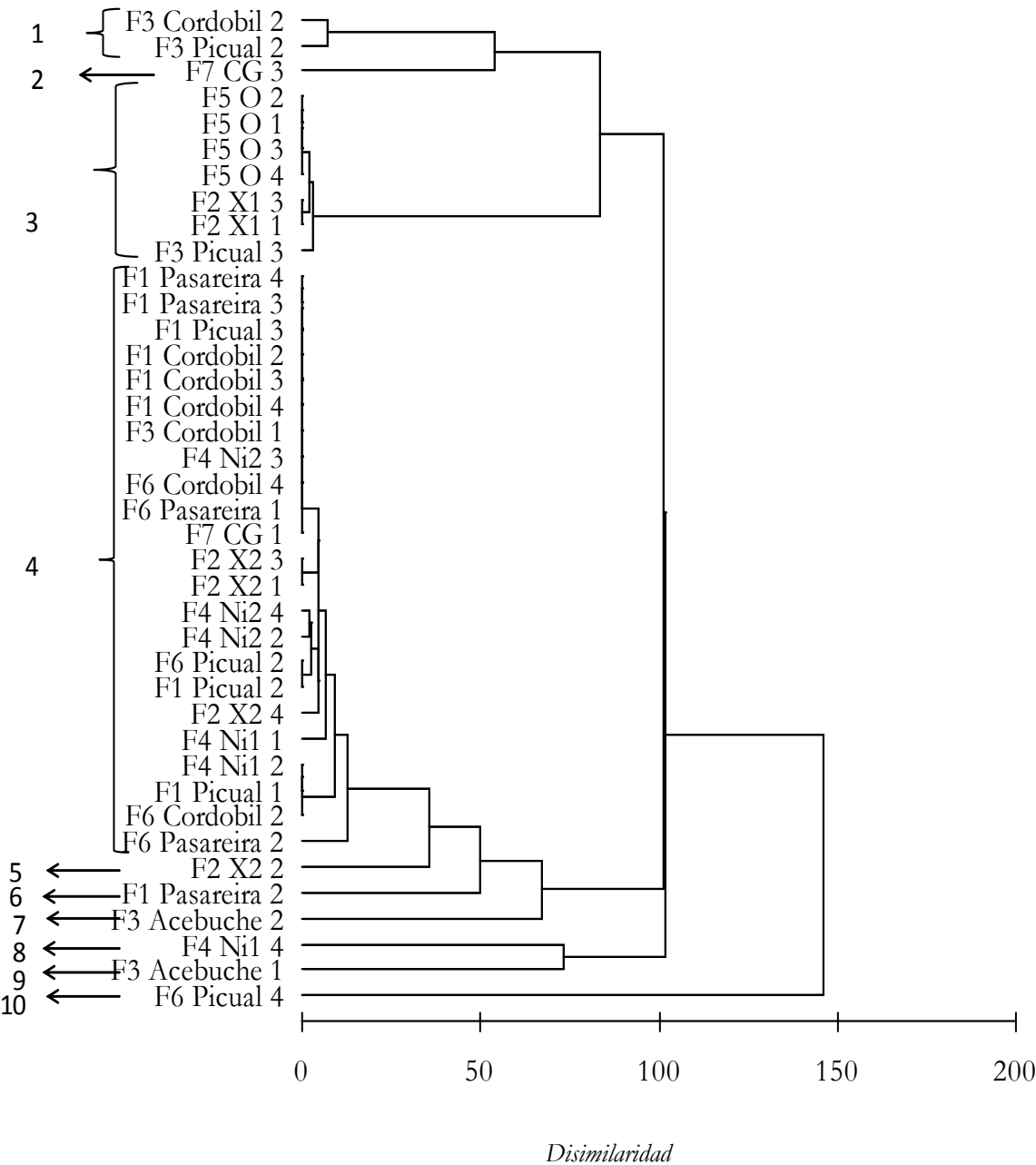
encuentra el único ejemplar de la finca 3 F3 Cordobil, 1 un árbol de 30 años; además están las plantas jóvenes de la finca 2 F2X2 3, F2 X2 1 y F2 X2 4; así mismo a este grupo pertenecen individuos de la plantación finca 4 cuya edad es superior a 40 años F4 Ni2 3, F4Ni2 4, F4 Ni2 2, F4Ni1 1 y F4 Ni1 2; de igual manera están 5 olivos de la finca 6, localizada en Villa de Leyva, F6 Cordobil 4, F6 Pasareira 1, F6 Picual 2, F6 Cordobil 2 y F6 Pasareira 2, árboles antiguos, más de 40 años, de los que se conoce producción pero que han sido propagados; por último en este grupo encuentra el árbol F7 CG1 con producción permanente y del cual se ha sacado material para las plantaciones de las fincas 1 y 2.

El (genotipo 5) está representado por el ejemplar F2 X2 2 un árbol joven ubicado en la vereda Monquirá, cabe anotar que esta planta la conocen los olivicultores como Vileyva de Tronco Verde, una denominación que le dieron al parecer por considerar que no muestra similitud con las que se han traído de otras partes del mundo y argumentan que puede proceder de un árbol multiplicado por semilla bajo las condiciones ambientales de la localidad.

De la finca 1 solo se encontró que el árbol F1 Pasareira 2 (genotipo 6) es el único con características genéticas diferentes a los demás representantes de esta finca analizados en el presente estudio; lo mismo ocurrió con el (genotipo 8) F4 Ni1 4 con respecto a la finca 4 y para el olivo F6 picual 4 (genotipo 10) de la finca 6, único individuo diferente del material vegetal de dicha finca. Mientras que para los individuos F3 Acebuche 2 (genotipo 7) y F3 Acebuche 1 (genotipo 9) de la finca 3 que en la región se conocen como olivo rustico, el dendrograma identifica dos plantas con genotipo diferente homonimia.

De lo anterior se puede resaltar que la finca 3 tiene la mayor cantidad de olivos de diferente genotipo (1, 3, 4, 7 y 8), la finca 2 tiene genotipos (3, 4 y 5), las fincas 1, 4 y 6 tienen árboles que corresponden en su mayoría al genotipo 4 y solo un ejemplar de cada una de ellas corresponde a un genotipo diferente. (6, 8 y 10) respectivamente como se observa en la (figura 1).

Figura 1 Dendrograma relativo al análisis con marcadores microsatelite (SSR) obtenido mediante UPGMA Cluster Analysis e indicadores de similitud de Euclidea.



Respecto a la dimensión de los alelos de los genotipos aislados, el genotipo 1 esta diferenciado por 4 alelos DCA9 189-185 y DCA 18 177-183, señalados en la (tabla 2). entre tanto el genotipo 2 es diferente respecto a los anteriores por los alelos DAC16 155, UDO43 175 y 177, además del UDO 18 177 respecto solo al genotipo 1 F3 picual 2.

Del genotipo 3 se puede decir que los arboles F5 O2, F5 O1, F5 O3 y F5 O4, no muestran diferencia entre ellos, es decir hay sinonimia, pero si con respecto a F2X1 3 y F2 X1 1 en el alelo EMO90 185 y de estos respecto al F3 picual 3 en DCA5 209 y DCA9 209 como se observa en la (Tabla 1).

En el genotipo 4 hay sinonimia en los arboles F1 Pasareira 1, F1 Pasareira 3, F1 Picual 3, F1 Cordobil 2, F1 Cordobil 3, F1 Cordobil 4, olivos jóvenes de la finca1, así como F3 Cordobil 1, F4 Ni2 3, F6 Cordobil 4, F6 Pasareira 1 y F7CG 1 como se registra en la (tabla 2) pero estos se diferencian con F2X2 3 y F2 X2 1 en GAPU 193 y EMO90 185 dentro del mismo grupo.

Las muestras F4Ni2 4 y F4 Ni2 2 de árboles viejos, se diferencian en los alelos DCA17 185 GAPU191 y EMO90 185, mientras que F6 Picual 2 y F1 Picual 2 tienen como alelos diferentes DCA17 185 señalados en la (tabla 2).

El olivo F2X2 4, una planta joven, tiene como alelos diferentes DCA16 170 y DCA17 185, mientras que el F4 Ni2 1 un árbol de más de 40 años se diferencia por los alelos DCA16 163-176, DCA17 185 y DCA18 171-179. Las plantas F4 Ni1 2, F1 Picual 1 y F6 Cordobil 2 no tienen diferencia entre ellas, pero son diferentes con el resto del grupo en el alelo DCA17 191; finalmente el último individuo del grupo, F6 Pasareira 2 presenta como diversos los alelos DCA16 157-176 y DCA17 191 (Tabla 2).



Tabla 5 Dimensión de los alelos de los genotipos aislados y analizados con marcadores SSR para diez locus (DCA, UDO, GAPU, EMO).

CV	DCA3		DCA5		DCA9		DCA16		DCA17		DCA18		UDO43		GAPU101		GAPU103		EMO90	
F3 Cordobil 2	239	249	207	207	<u>189</u>	193	127	157	113	115	171	<u>177</u>	212	216	193	219	138	138	187	187
F3 Picual 2	239	249	207	207	<u>185</u>	193	127	157	113	115	171	<u>183</u>	212	216	193	219	138	138	187	187
F7 CG 3	239	249	207	207	185	193	127	155	113	115	171	177	175	177	193	219	138	138	187	187
F5 O 2	239	249	207	207	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	187	187
F5 O 1	239	249	207	207	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	187	187
F5 O 3	239	249	207	207	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	187	187
F5 O 4	239	249	207	207	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	187	187
F2 X1 3	239	249	207	207	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	<u>185</u>	187
F2 X1 1	239	249	207	207	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	<u>185</u>	187
F3 Picual 3	239	249	<u>209</u>	<u>209</u>	185	195	125	127	115	181	171	181	177	220	193	202	138	138	187	187
F1 Pasareira 4	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Pasareira 3	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Picual 3	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Cordobil 2	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Cordobil 3	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Cordobil 4	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F3 Cordobil 1	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F4 Ni2 3	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F6 Cordobil 4	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F6 Pasareira 1	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F7 CG 1	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F2 X2 3	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	<u>193</u>	<u>185</u>	187
F2 X2 1	239	253	207	215	193	195	166	179	115	181	173	181	175	177	186	202	162	<u>193</u>	<u>185</u>	187
F4 Ni2 4	239	253	207	215	193	195	166	179	115	<u>185</u>	173	181	175	177	186	202	162	<u>191</u>	<u>187</u>	187
F4 Ni2 2	239	253	207	215	193	195	166	179	115	<u>185</u>	173	181	175	177	186	202	162	<u>191</u>	<u>185</u>	187
F6 Picual 2	239	253	207	215	193	195	166	179	115	<u>185</u>	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Picual 2	239	253	207	215	193	195	166	179	115	<u>185</u>	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F2 X2 4	239	253	207	215	193	195	<u>170</u>	179	115	<u>185</u>	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F4 Ni1 1	239	253	207	215	193	195	<u>163</u>	176	115	<u>185</u>	<u>171</u>	<u>179</u>	175	177	186	202	162	189	187	187
F4 Ni1 2	239	253	207	215	193	195	166	179	115	191	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F1 Picual 1	239	253	207	215	193	195	166	179	115	191	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F6 Cordobil 2	239	253	207	215	193	195	166	179	115	191	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F6 Pasareira 2	239	253	207	215	193	195	157	176	115	191	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F2 X2 2	239	253	207	215	193	195	144	151	115	181	173	181	175	177	186	202	162	189	185	187
F1 Pasareira 2	239	253	207	166	193	195	166	179	115	185	173	181	175	177	186	202	162	189	187	187
F3 Acebuche 2	232	232	195	207	173	195	125	148	115	167	177	179	171	179	200	202	179	191	187	189
F4 Ni1 4	239	255	199	215	167	195	151	168	188	188	165	181	183	183	186	200	162	162	189	189
F3 Acebuche 1	239	255	199	207	185	195	120	136	181	191	165	181	220	220	186	193	150	159	187	189
F6 Picual 4	239	149	207	207	185	193	127	157	113	115	171	177	212	216	193	219	138	138	187	187

Tabla. 6 –Dimensión de los alelos (pb) identificados en el análisis de la población, número de alelos amplificados por locus (n), frecuencia alélica (f), heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_E$ ). las letras indican los alelos por cada locus.

Allele	Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus	
	DCA3	f	DCA5	f	DCA9	f	DCA16	f	DCA17	f	UDO18	f	UDO43	f	GAPU101	f	GAPU103	f	EMO90	f
<i>a</i>	149	0,01	166	0,01	167	0,01	120	0,01	113	0,05	165	0,02	171	0,01	186	0,34	138	0,28	185	0,07
<i>b</i>	232	0,02	195	0,01	173	0,01	125	0,10	115	0,47	171	0,15	175	0,33	193	0,15	150	0,01	187	0,87
<i>c</i>	239	0,48	199	0,02	185	0,14	127	0,14	167	0,01	173	0,30	177	0,42	200	0,02	159	0,01	189	0,05
<i>d</i>	249	0,13	207	0,60	189	0,01	136	0,01	181	0,28	177	0,05	179	0,01	202	0,42	162	0,34		
<i>e</i>	253	0,32	209	0,02	193	0,37	144	0,01	185	0,08	179	0,02	183	0,02	219	0,05	179	0,01		
<i>f</i>	255	0,02	215	0,32	195	0,44	148	0,01	188	0,02	181	0,42	212	0,03			189	0,26		
<i>g</i>							151	0,02	191	0,06	183	0,01	216	0,03			191	0,03		
<i>h</i>							155	0,01					220	0,11			193	0,02		
<i>i</i>							157	0,05												
<i>l</i>							163	0,01												
<i>m</i>							166	0,26												
<i>n</i>							168	0,01												
<i>o</i>							170	0,01												
<i>p</i>							176	0,02												
<i>q</i>							179	0,28												
<i>r</i>																				
<b>n</b>	6		6		6		15		7		7		8		5		8		3	
<b>H<sub>0</sub></b>	0,974		0,717		1,000		1,000		0,974		1,000		0,948		1,000		0,692		0,205	
<b>H<sub>E</sub></b>	0,642		0,532		0,640		0,812		0,679		0,698		0,692		0,674		0,725		0,231	

Respecto a las dimensiones de los alelos y su frecuencia (Tabla 3) se observa para el caso del cebador DCA3 un alelo de dimensión 239 con una frecuencia del 48 % mientras que los menos frecuentes son 149 y 232 con 1 y 2% respectivamente; para 6 alelos amplificados, donde la heterocigosis observada es de 0,974 y la de esperada de 0,642 indicando una mayor diversidad.

De otra parte el cebador DCA5 muestra que la zona del microsatélite más repetida corresponde al alelo 207 con el 60% y los más particulares son 166 y 195 con 1,2% de frecuencia de los 6 alelos amplificados; mientras que la heterocigosis observada es de 0,717 y la esperada de 0,532 indicando menor diversidad que el caso anterior (Tabla 2).

Para el caso del cebador DCA9 la mayor frecuencia está en el alelo 195 con el 44,8% y los menos frecuentes corresponden a 167, 173 y 189 con el 1,2% de los 6 alelos amplificados, donde la heterocigosis observada fue 1 y la esperada de 0,640 dejando ver una alta heterocigosis.

El cebador que mostro mayor polimorfismo fue DCA16 con 15 alelos amplificados donde la mayor frecuencia la tiene el 179 con un 28,2% seguido del 166 con 26,9% mientras que los menos frecuentes son 120, 136, 144, 148, 155, 163, 168, y 170 con el 1,2% cada uno; este es el cebador de mayor polimorfismo con una heterocigosis observada de 1 y esperada de 0,812.

El cebador DCA17 amplifico el 47,4% al alelo 115 como el más frecuente y al 167 con 1,2% de 7 alelos amplificados que mostraron una heterocigosis observada de 0,974 y una esperada de 0,679; mientras que con el cebador UDO18 la zona de mayor amplificación para 7 alelos la tuvo el alelo 181 con el 42,3% de repeticiones y el de menor frecuencia para este mismo fue el 183 con 1,2%, mostrando una heterocigosis observada de 1 y esperada de 0,698, lo que indica diversidad.

En el caso del cebador UDO43 existe una zona de amplificación del microsatélite del 42,3% para el alelo 177 con dos alelos de menor frecuencia de amplificación 171 y 179 con 1,2% cada uno, en este caso el cebador amplifico 8 alelos en el locus que mostraron una heterocigosis observada de 0,948 y esperada de 0,692.

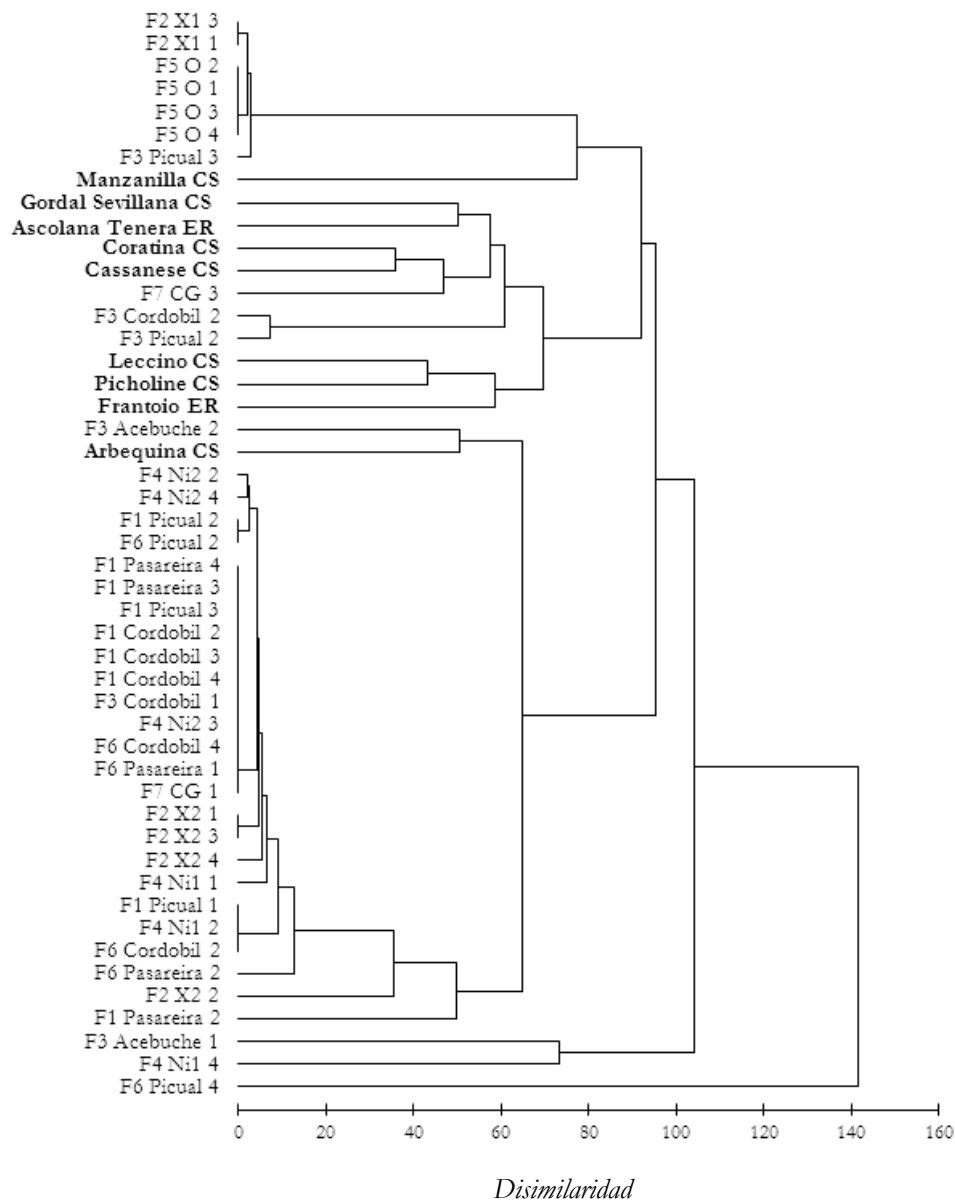
De los 5 alelos amplificados en el locus por el cebador GAPI101 existe una frecuencia de 42,3% para el alelo 202, mientras que el alelo 200 fue el menos frecuente con 2,5%, en este caso la heterocigosis observada fue de 1 y la esperada de 0,647 es decir hay diversidad.

De acuerdo con los datos reportados el cebador GAPI 103 que amplifico 8 alelos muestra que la zona más repetida del microsatélite fue para el alelo 162 con el 34,6% seguido del 138 con 28,2% mientras que los menos frecuentes fueron 150, 159 y 179 con 1,2% cada uno.

El cebador que menos alelos amplifico fue EMO90 señalando que la mayor repetición la mostro el alelo 187 con 87,1% y el menos frecuente el 189 con 7,6% de tres alelos amplificados, mostrando una heterocigosis observada de 0,205 y esperada de 0,231 lo que indica mayor homogeneidad dada la mayor frecuencia de un solo alelo.

No se han podido identificar los genotipos encontrados en el estudio utilizando la base de datos que existe en el departamento de Biología Evolutiva y Funcional de la Universidad de Parma, como se aprecia en la (Grafica 2), dado que no corresponden a las variedades españolas: Manzanilla, Gordal Sevillana y Arbequina, tampoco a las italianas Ascolana Tenera, Coratina, Cassanese, Leccino y Frantoio, ni a la francesa Picholine.

*Figura 2 Dendrograma relativo a la comparación de los genotipos colombianos con respecto a genotipos de Italia, España y Francia.*



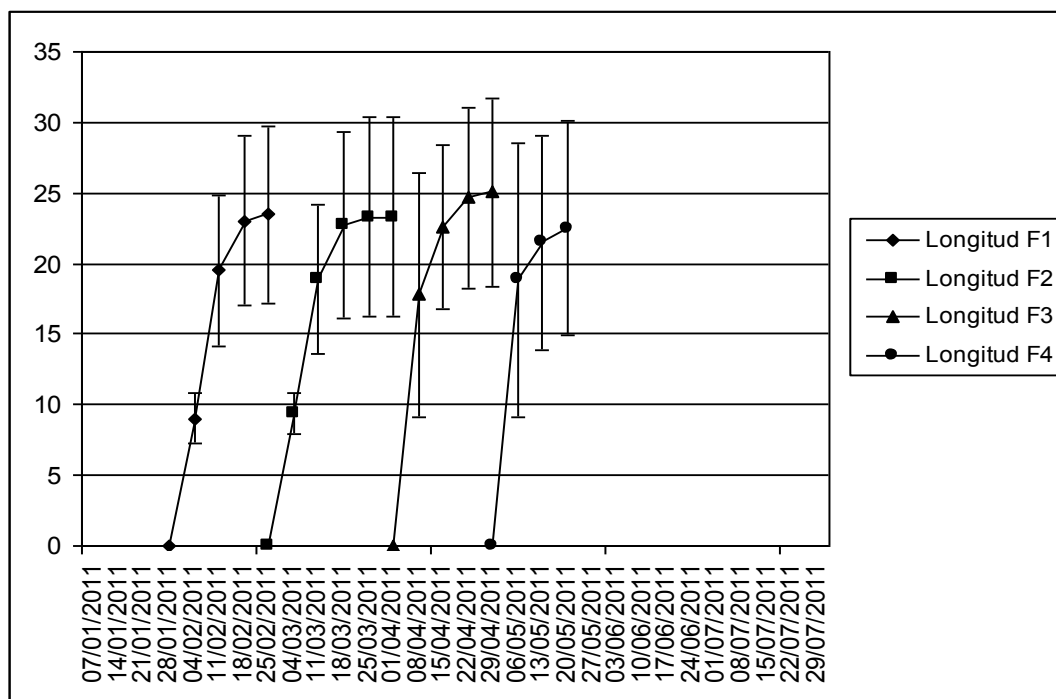
## 2. Análisis Morfológico

En general para todos los genotipos encontrados en el presente estudio la floración no se concentra en un solo periodo del año, sino que se da en dos y hasta en cuatro épocas que regularmente inician en enero y se extienden hasta febrero para algunas plantas, llegando hasta junio en la última floración que estas presentan.

### 2.1. Crecimiento de las inflorescencias

El crecimiento de las inflorescencias del genotipo 1 se da en un periodo de 4 semanas para la primera, con una longitud de 23,4mm; mientras que para la segunda ésta dura 5 semanas con la misma medida como se aprecia en la (Figura 3). Por otra parte en la tercera se registró la misma duración de la primera, aunque su longitud fue de 25mm, sin embargo para la última floración de esta planta la longitud fue de 22,5mm la cual fue alcanzada en un periodo de 3 semanas. De otra parte se encontró que el crecimiento de las floraciones 2, 3 y 4 comienza al final de la anterior como se observa en la (Figura 3).

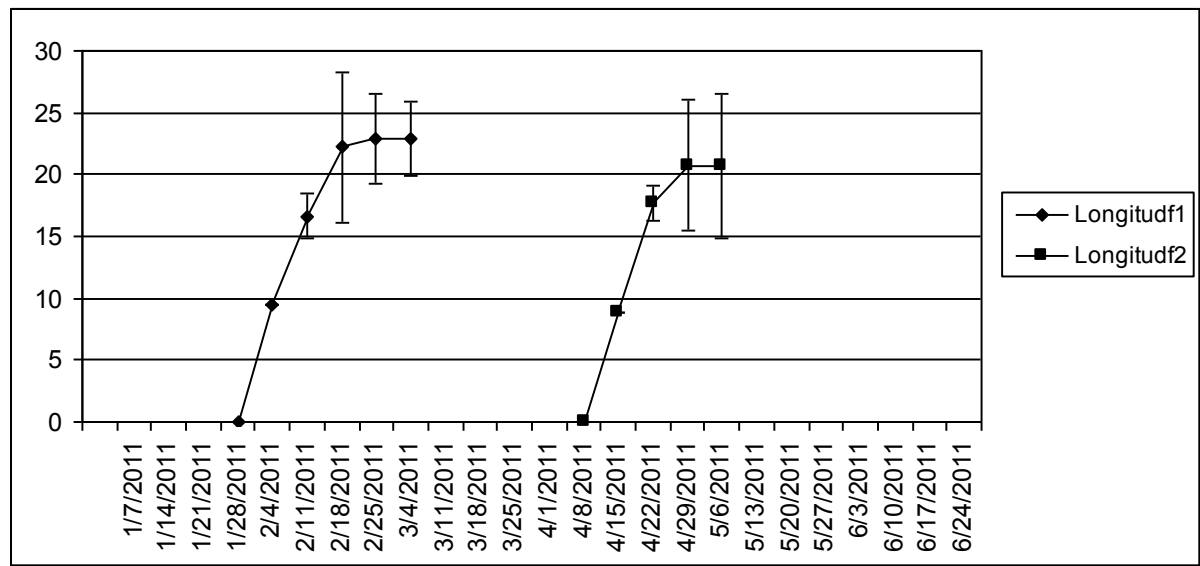
Figura 3 Longitud inflorescencias genotipo 1



Para el genotipo 3 el crecimiento de las inflorescencias de la primera y segunda floración se mantuvo durante cuatro semanas, en la primera la longitud fue de 22,8 mm mientras que en la segunda

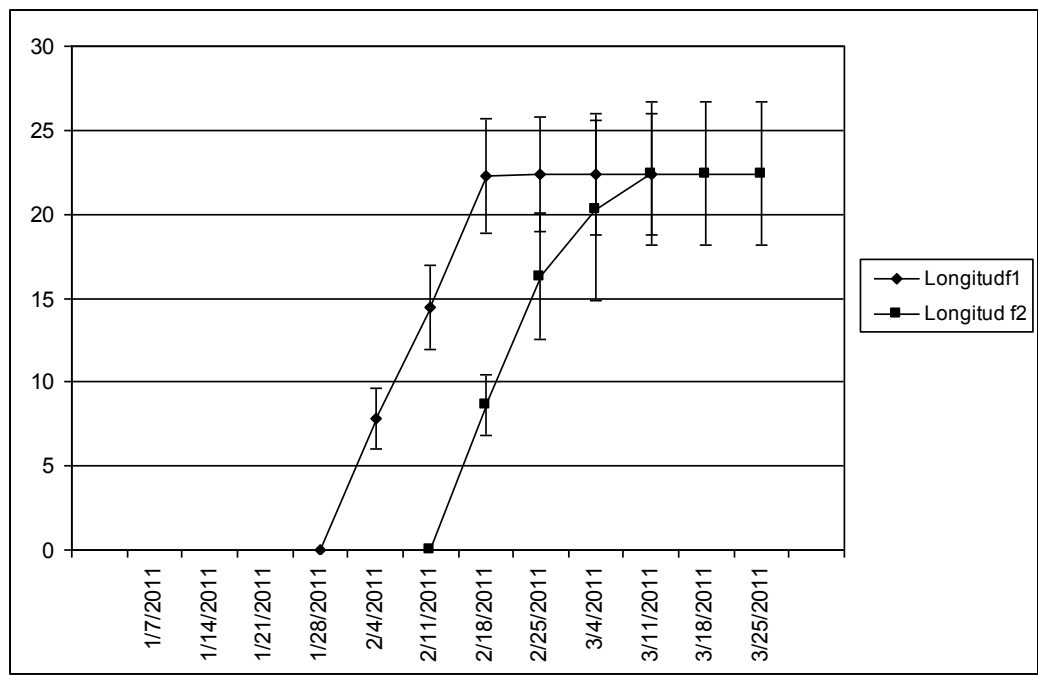
se redujo a 20,7 mm (Figura 4), la segunda floración se presentó 4 semanas después de terminada la primera.

Figura 4 Longitud inflorescencias genotipo 3



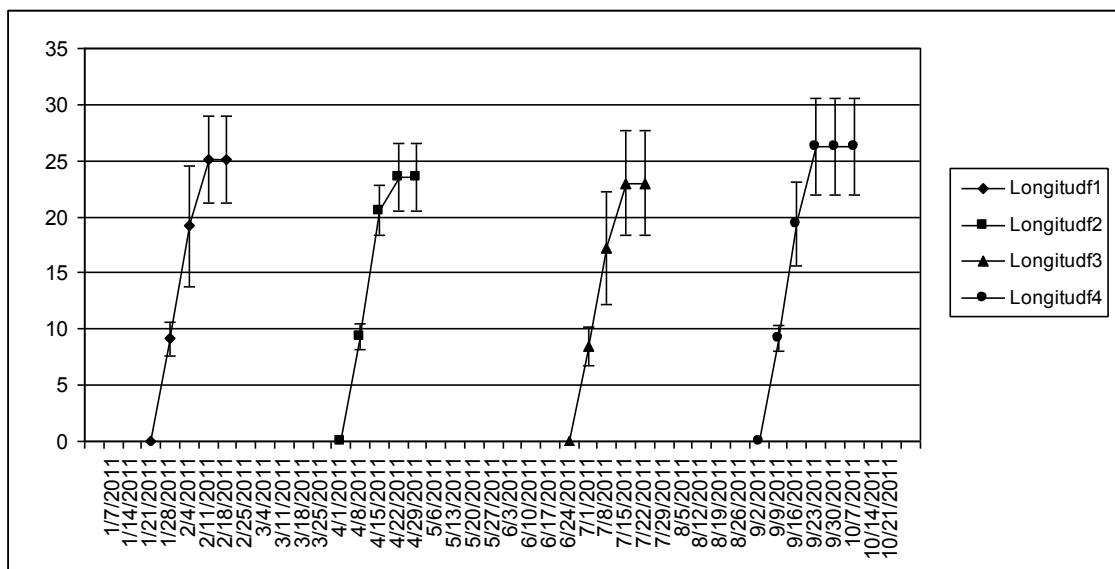
El crecimiento de las inflorescencias de la primera floración del genotipo 4A correspondiente a un árbol de 4 años, inicia el 14 de enero y tuvo una duración de 5 semanas logrando una longitud de 22,3 mm (Figura 5) mientras que la segunda comenzó 2 semanas después con una duración de 4 semanas, alcanzando la misma longitud.

Figura 5 Longitud inflorescencias genotipo 4A



El genotipo 4B que corresponde a un árbol de más de 30 años, mostró cuatro floraciones, la primera se inició el 21 de enero y en un lapso de 3 semanas alcanzó los 25,1mm de longitud, la misma duración tuvieron las demás (Figura 6); pero para la 2 su longitud fue de 23,5mm. La 3 tuvo una longitud de 23 mientras que la 4 alcanzó una longitud de 26,2mm; estas floraciones se dan con intervalos de 6 semanas entre la finalización de la primera y el comienzo de la segunda, 8 semanas entre ésta y la tercera y pasadas 6 semanas de finalizada ocurre la cuarta.

Figura 6 Longitud inflorescencias genotipo 4B



Las inflorescencias del genotipo 5 presentaron diferencia en tiempo de crecimiento y longitud dado que en la primera, esta etapa se mantuvo por 3 semanas y llegó a 23,3mm de longitud, mientras que para la segunda tardó una semana más y la dimensión alcanzada fue de 24,7mm (Figura 7); en este caso se presenta una diferencia de 4 semanas después de haberse terminado la primera.

La longitud alcanzada por las inflorescencias del genotipo 6 fue de 26,7, 24,4 y 25,1mm respectivamente (Figura 8) con un tiempo de duración en el crecimiento de tres semanas; para los tres casos; se evidencia que la segunda floración inicia 12 semanas después de finalizar la primera, y la tercera a las 11 semanas de finalizar la segunda.

El genotipo 10 mostró dos floraciones con inflorescencias que alcanzaron los 25,5mm y una duración en su crecimiento de 4 semanas en ambos casos (Figura 9); la segunda floración se dio 12 semanas después de finalizar la primera.

Figura 7 Longitud inflorescencias genotipo 5

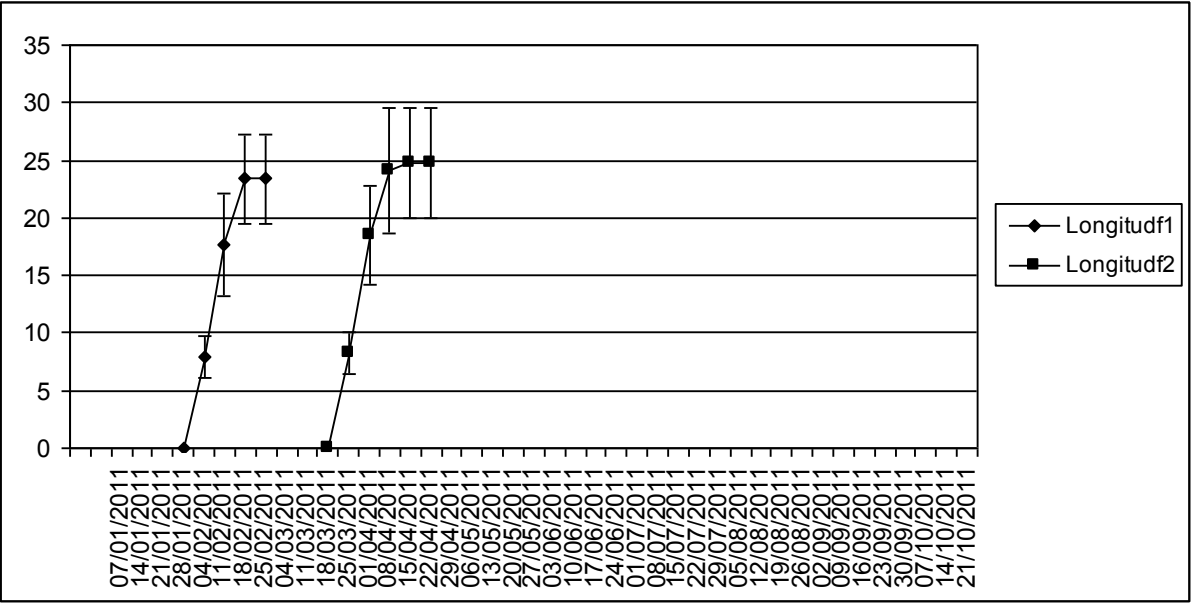


Figura 8 Longitud inflorescencias genotipo 6

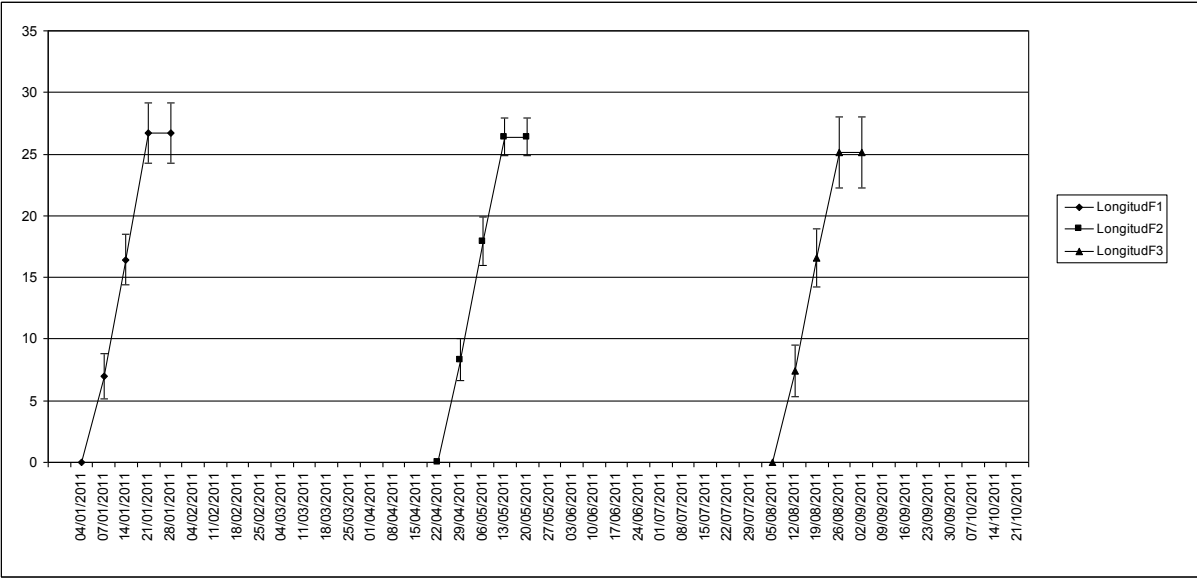
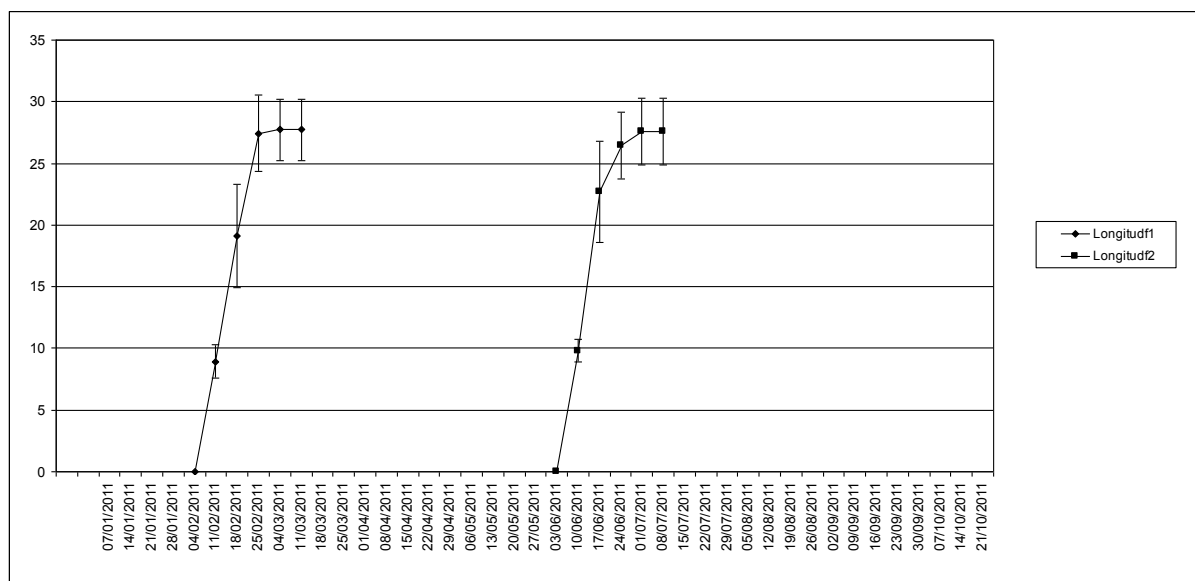




Figura 9 Longitud inflorescencias genotipo 10



En general en todos los casos estudiados se observa que las longitudes no presentan diferencias significativas y oscilan entre 22 y 25mm en promedio. De otra parte, el genotipo 1 concentra sus 4 floraciones en 16 semanas, el genotipo 4A lo hace en 8 semanas; mientras que el genotipo 3 separa una floración de otra en 4 semanas y el 5 en 3 semanas. El genotipo 4B separa sus floraciones 8 semanas finalizada la una del comienzo de la siguiente y los genotipos 6 y 10 son los que mostraron mayor separación entre una floración y otra (12 semanas).

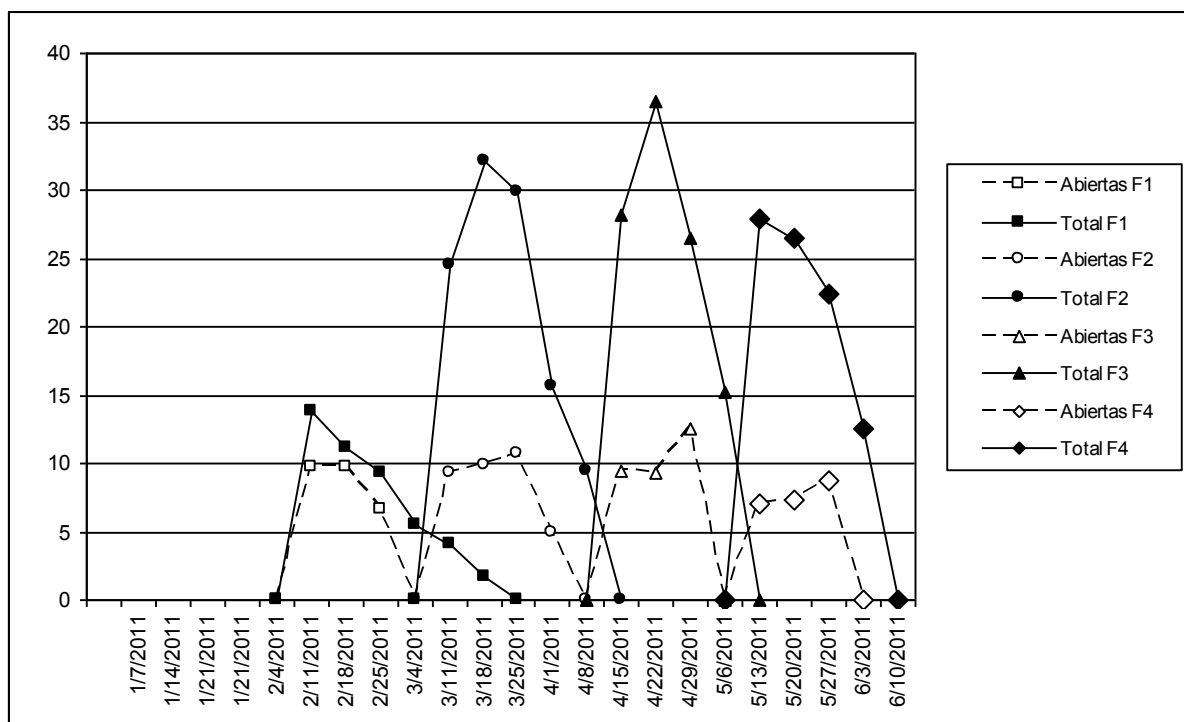
## 2.2. Época de floración

Se define la floración como la apertura de los botones de las flores, esto hace visibles los órganos reproductores hasta la caída de los estambres y de los pétalos; inicia con la expansión de la corola que hace visible las antera de color amarillo brillante y se llega a la plena floración con el distanciamiento de los pétalos alargamiento de los estambres y del estilo que dejan ver el estigma; la floración se completa con la dehiscencia de las anteras y finaliza con el oscurecimiento de estas y su distanciamiento; finalmente ocurre la caída de pétalos. La floración de los olivos en la zona de estudio se distribuye durante un periodo prolongado de 10 meses en los diferentes genotipos estudiados, sin embargo la intensidad de la misma varía entre los diversos genotipos y respecto a la edad de los árboles.

En la (Figura 10) se observa que la floración de este olivo comienza en el mes de febrero y termina en agosto, se distribuye en cuatro etapas evidenciándose que, finalizando una floración

comienza la siguiente; cada una muestra un pico de máximo número de flores donde se aprecia que en el primer ciclo hay menor cantidad de flores por inflorescencia, sin embargo se da una mayor concentración en la primera floración en la que se contaron 41 inflorescencias, las cuales tuvieron en promedio 14 flores cada una; mientras que la segunda solo presentó 10 inflorescencias con 32 flores en promedio cada una; la tercera floración con 7 inflorescencias que en promedio tuvieron 36 flores cada una y por último la cuarta floración con 10 inflorescencias que tienen 22 flores cada una.

Figura 10 Floración genotipo 1



Este genotipo muestra como resultado de floración dos periodos diferentes, donde el primero tiene una duración de 6 semanas mientras que el segundo resulta más corto con 5 semanas, como lo indica la (Figura 11); además se observó que la primera floración es más abundante con 23 inflorescencias que en promedio tenían 22 flores cada una. Entre tanto en el segundo periodo el número de flores disminuyó a la mitad de inflorescencias pero con igual cantidad de flores por rama como se observa en la (Figura 11).

Para este genotipo se analizó el comportamiento de la floración de un árbol nuevo denominado 4A (Figura 12) donde se aprecian floraciones concentradas en dos meses, la primera comienza en febrero y dos semanas después inicia una segunda floración; en la primera se contaron 9 inflorescencias con un promedio de 20 flores cada una, mientras que en la segunda el número de inflorescencias

aumentó a 11 las cuales en promedio tenían 22 flores cada una; la primera floración se mantuvo durante 4 semanas mientras que la segunda permaneció por 6 semanas.

Figura 11 Floración genotipo 3

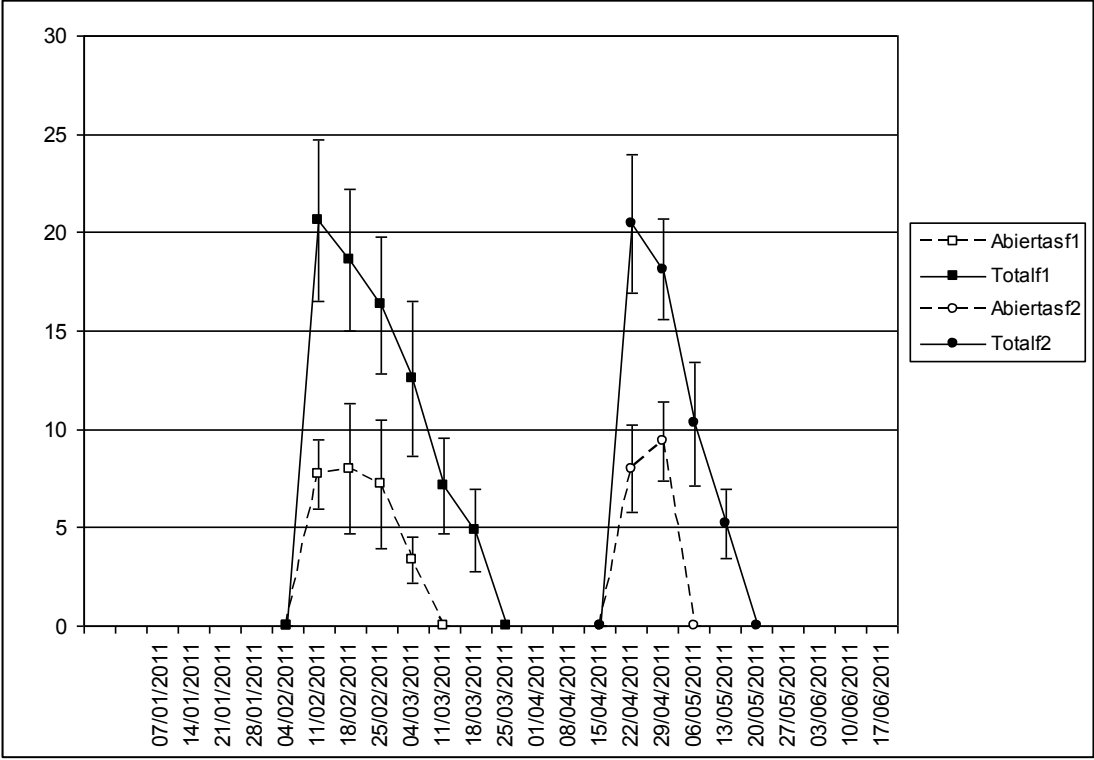
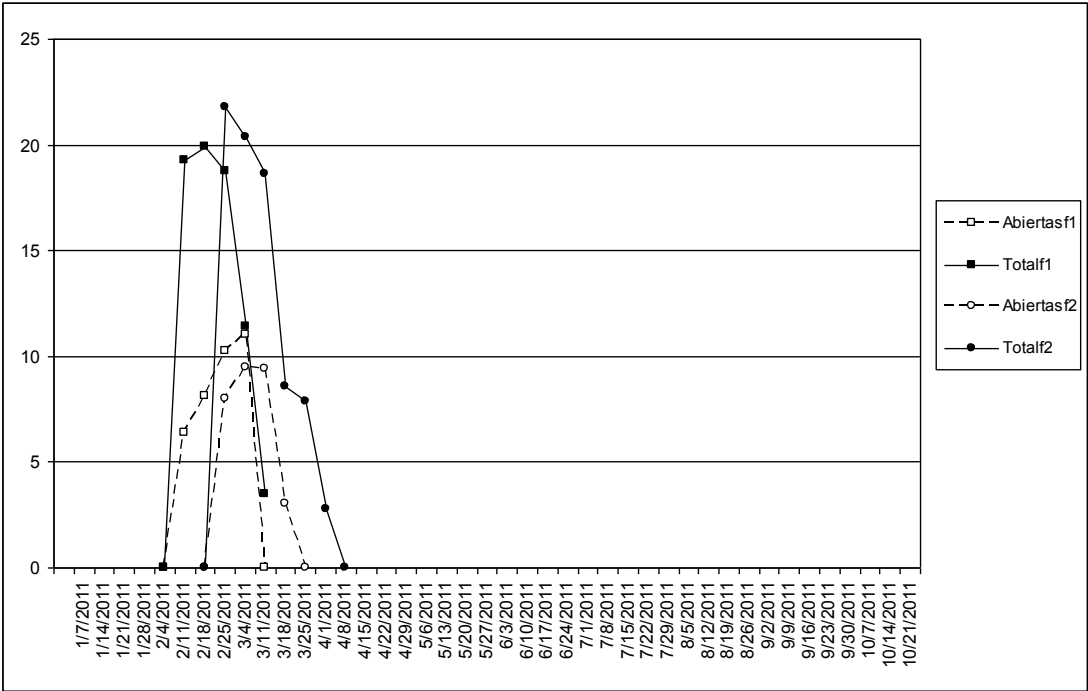
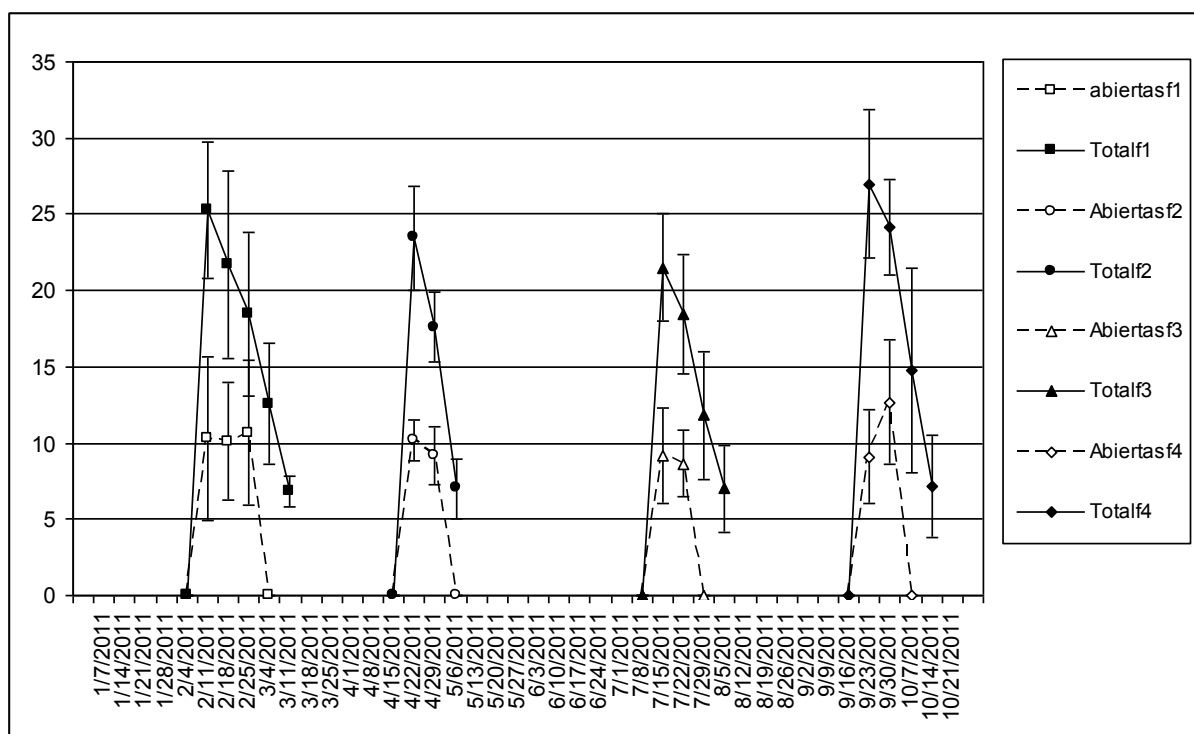


Figura 12 Floración genotipo 4A



El comportamiento en la floración del genotipo 4B que corresponde a un árbol de 30 años es diferente al del mismo genotipo pero de un árbol nuevo como se aprecia en la (Figura 13), aquí se observa que en el periodo de estudio ocurrieron 4 floraciones distanciadas una de la otra por 6 y 8 semanas; la primera dura aproximadamente 6 semanas, mientras que la segunda, tercera y cuarta se mantuvieron por 4 semanas en promedio. De otra parte en la primera floración se contaron 17 inflorescencias con una media de 26 flores cada una, en la segunda se redujo a 7 con 23 flores en promedio, mientras que en la tercera se duplicó respecto a ésta con 14 inflorescencias que tenían 22 flores cada una y para el caso de la última la cantidad de inflorescencias fue de 11 con el mayor número de flores (27) en promedio por cada una.

Figura 13 Floración genotipo 4B



El genotipo 5 corresponde a un árbol joven cuyo comportamiento de la floración se establece en dos periodos continuos: la segunda floración empieza 3 semanas después de terminada la inicial; en la primera como se observa en la (Figura 14), el tiempo de duración fue de 5 semanas, mientras que la segunda duró cuatro; en el primer periodo se registraron 45 inflorescencias, las cuales presentaron 21 flores en promedio cada una, y para el segundo se contaron 29 con 25 flores cada una.

La planta correspondiente al genotipo 6 con una edad de 4 años, tuvo durante el periodo de estudio tres ciclos de floración (Figura 15) distanciados la primera de la segunda por 16 semanas y ésta de la tercera por 15 semanas, desde el comienzo de cada una, Se observa que la duración de la floración

en las dos primeras fue de cuatro semanas, mientras que en la tercera se mantuvo durante tres. De otra parte en el primer ciclo presentó 7 inflorescencias, en el segundo 10 y en el último 7; además estas mostraron en promedio 24 flores por inflorescencia cada una.

Figura 14 Floración genotipo 5

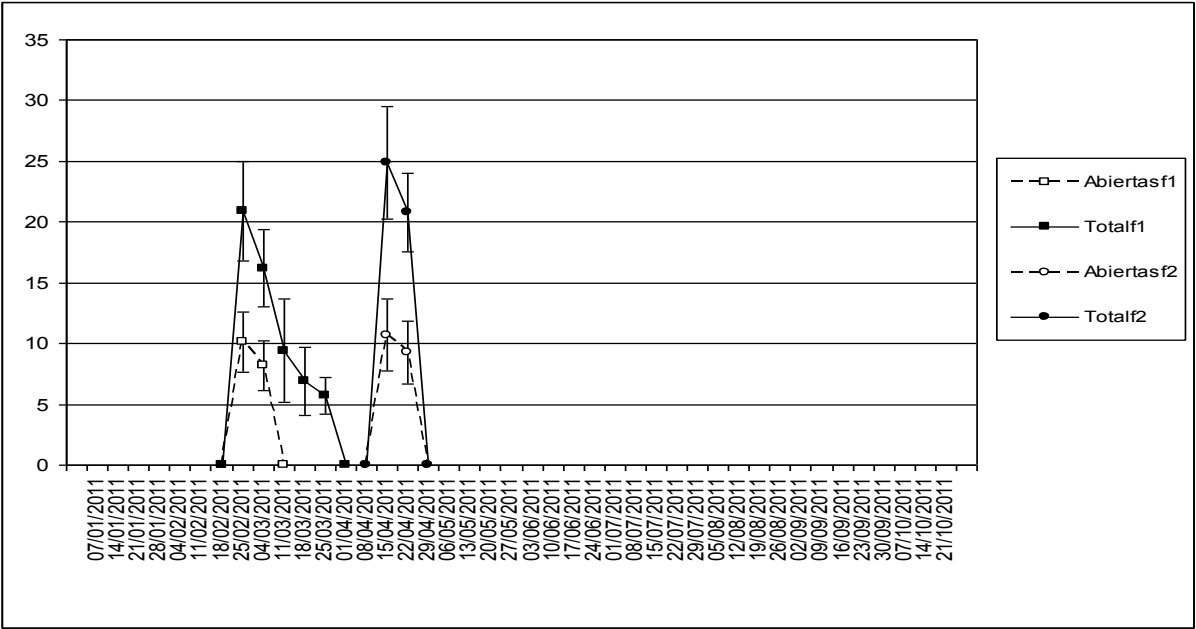
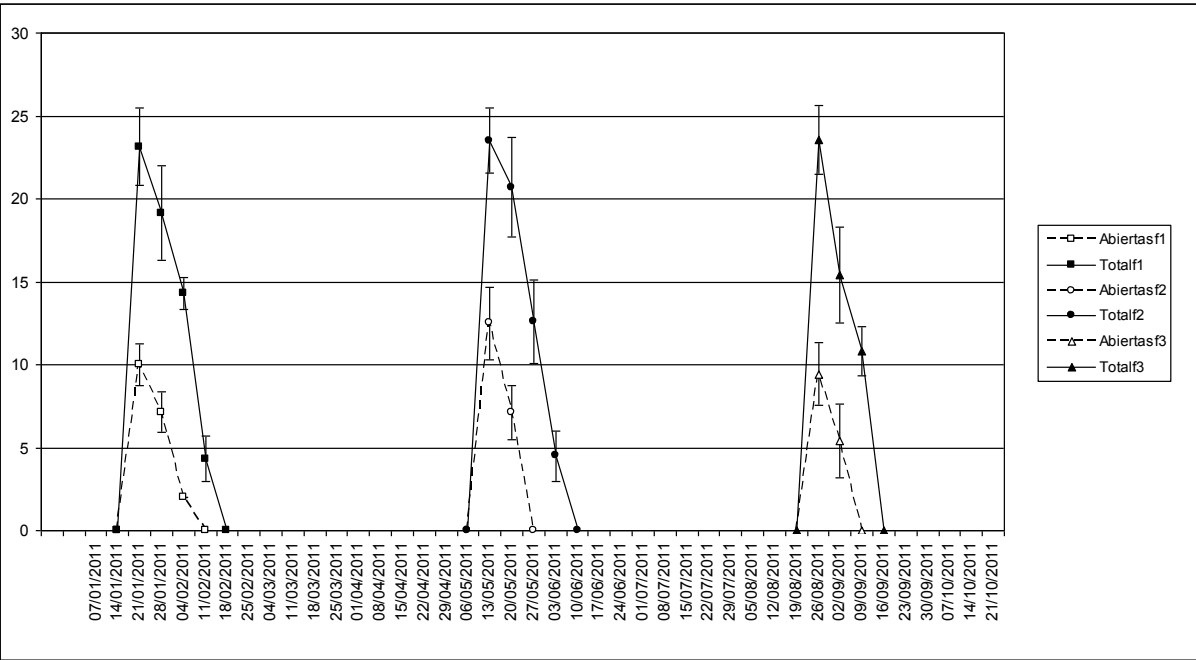
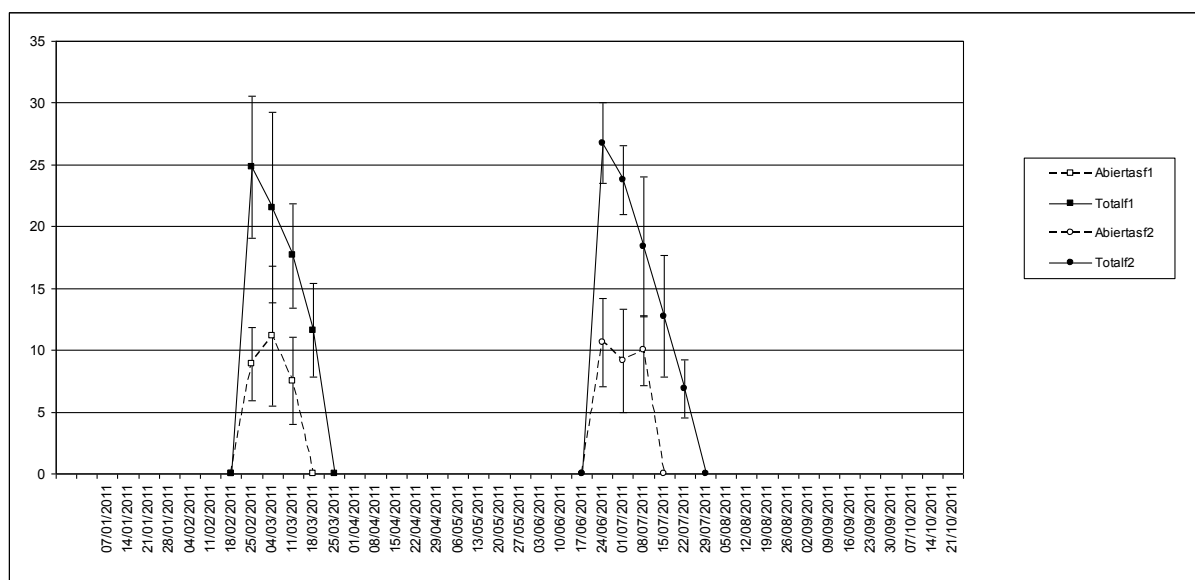


Figura 15 Floración genotipo 6



La floración del genotipo 10 ocurrió en dos ciclos, el primero de febrero 25 a marzo 13 y el segundo de junio 24 a julio 22, lo que deja ver que éste último presentó mayor permanencia (Figura 16); de otra parte en la primera floración se contaron 14 inflorescencias con 24 flores en promedio y para la segunda el número de inflorescencias fue de 16 con 27 flores en promedio cada una.

Figura 16 Floración genotipo 10



Al comparar el compartimento de un árbol nuevo y uno de 30 años en el mismo genotipo 4A y 4B se observa que el árbol de 4 años concentra la floración en dos meses, mientras que el árbol viejo la distribuye en cuatro ciclos durante 10 meses; así mismo muestra que la cantidad de inflorescencias por ciclo es diferente, lo mismo ocurre con el número de flores por inflorescencia donde el árbol viejo supera al nuevo, dado que éste tiene en promedio 24, mientras que el árbol nuevo tiene 21.

El genotipo 1 concentró las 4 floraciones entre febrero y agosto, teniendo una a continuación de la otra, mientras que los genotipos 3, 4B, 6 y 10 las separan; se observa que el genotipo 1 tiene mayor floración, y número de flores por inflorescencia que los demás, sin embargo el grupo que separa las floraciones muestra un número similar de flores por inflorescencia 24,3 en promedio y en todos los casos el número de inflorescencias es similar.

De acuerdo con los datos obtenidos por Montali (2006) la floración en Salsomaggiore Terme, provincia de Parma se presenta entre 19 y 21 días entre mayo y junio; y según lo manifestado por Deidda et al., (2003), en el ambiente olivícola del Mediterráneo la floración puede variar entre 5 y 20 días dependiendo de las condiciones ambientales y fisiológicas de la planta, pero siempre entre la mitad de mayo y la mitad de junio; en España las investigaciones de Barranco (2008) han mostrado

diferencias de más de 20 días entre años, dependiendo de las temperaturas en los meses anteriores. Los estudios de Donoso (2006) en Chile entre los años 2005-2006 para los meses de agosto septiembre registran 25 días en promedio. Entre tanto en la región del Alto Ricaurte en Colombia esta presenta intervalos de 3 a 6 semanas variando inclusive en la misma planta para las distintas floraciones del año, como se registra en las gráficas; además la apertura de las flores en la misma rama puede variar hasta en dos semanas, dado que las inflorescencias brotan en la misma rama con este tiempo de diferencia.

### 2.3. Crecimiento de Frutos

El crecimiento de los frutos empieza una semana después del cuajamiento hasta aproximadamente 15 semanas después, cuando inicia el cambio de color.

En el genotipo (Figuras 17 y 18) se observa que en el caso de las fructificaciones 1 y 2 la maduración empieza con una semana de diferencia pese a que el crecimiento de la segunda fructificación inicia tres semanas después de la primera, además la longitud de los primeros es ligeramente mayor de los segundos 1,2 mm y el grosor 0,5mm. De otra parte la tercera fructificación que inicia 7 semanas después de la primera se detiene durante 5 semanas luego de las cuales crece hasta alcanzar el volumen de los primeros en 13 semanas, iniciando la maduración 5 semanas después de la primera. Para el caso de la cuarta fructificación que inicia 7 semanas después de la primera su maduración comienza 8 semanas después de la primera y estos frutos tienen mayor tamaño que los demás como lo indican las (Figuras 17 y 18). En general el tamaño promedio de los frutos de este genotipo es de 21mm de largo por 11 de ancho.

Figura 17 Longitud de frutos genotipo 1

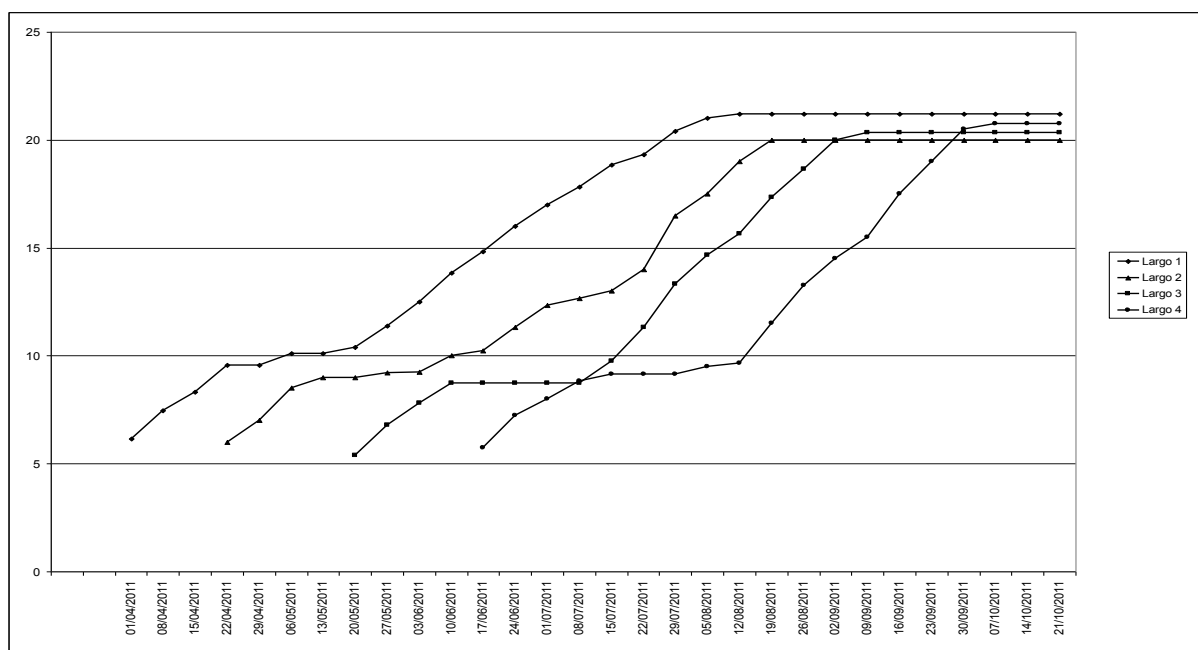
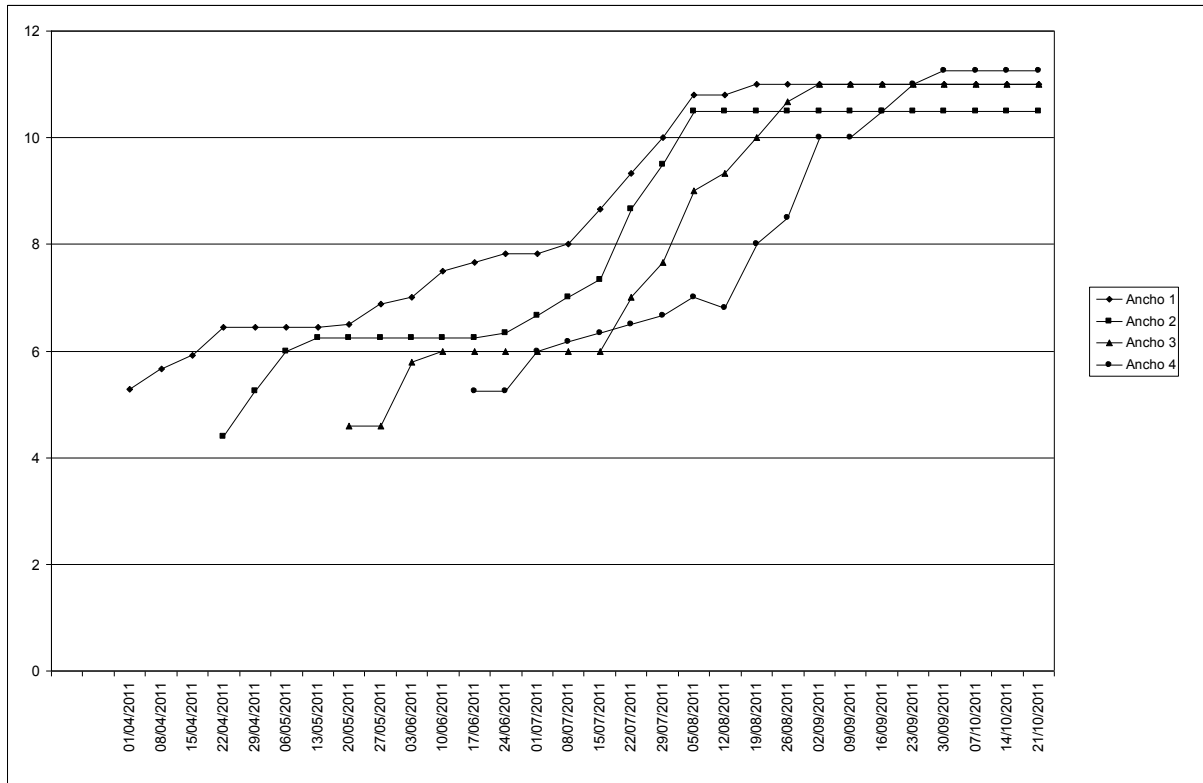
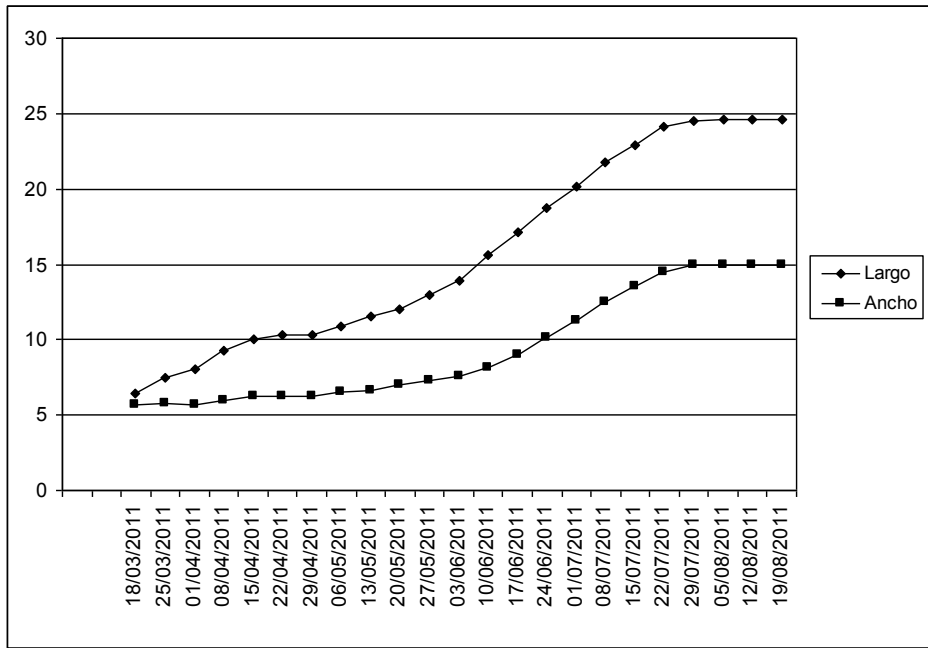


Figura 18 Ancho de frutos genotipo 1



El genotipo 3 (Fig. 19) presentó dos floraciones de las cuales tan solo la primera arrojó cosecha, se observó el inicio de la maduración 20 semanas después del comienzo de crecimiento, alcanzando una longitud de 24,6 mm y un grosor de 15 mm en promedio.

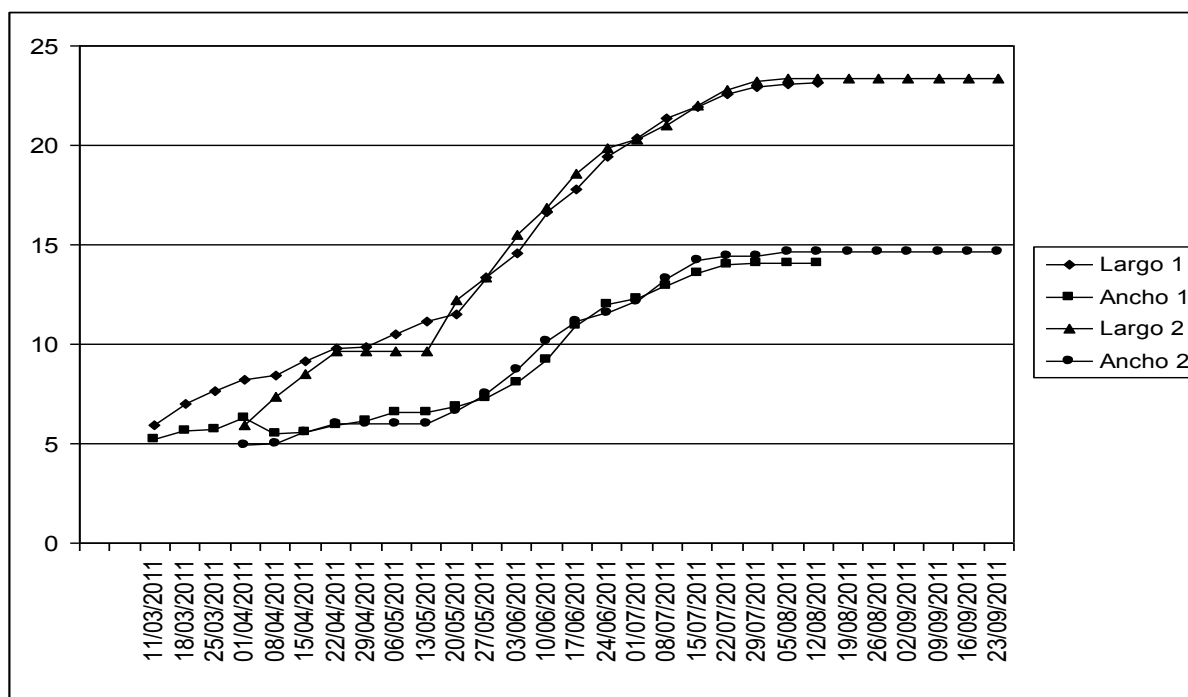
Figura 19 Longitud y ancho de frutos genotipo 3





En el genotipo 4A se presentaron dos fructificaciones, donde la primera que inicia el 11 de marzo alcanza el comienzo de la maduración el 12 de agosto con un largo de 23,1 mm y ancho de 14; entre tanto la segunda fructificación se da tres semanas después de la primera comenzando el periodo de maduración a las 19 semanas con un tamaño de 23,3 mm de largo y 14,6 de ancho (Figura 20).

Figura 20 Longitud y ancho de frutos genotipo 4A



La fructificación del genotipo 4B se manifiesta en cuatro etapas iniciando la primera el tres de marzo hasta su maduración a las 17 semanas con frutos que alcanzan los 23 mm de longitud por 12 de ancho (Figura 21 y 22); entre tanto, la segunda empieza el 6 de mayo e inicia su maduración en el mismo tiempo que la anterior, mostrando un tamaño de fruto de 22mm por 11,5 la tercera fructificación viene 22 semanas después de la primera y la cuarta a las 32

El genotipo 5 presenta dos épocas de fructificación, la primera inicia el 25 de marzo llegando a su etapa de maduración a las 17 semanas con un tamaño de 20,5mm de largo y 11 mm de ancho; así mismo la segunda empieza 7 semanas después llegando a la maduración con 18,5mm de largo y 10 mm de ancho (Figura 23).

El genotipo 6 presenta fructificación durante 3 periodos que comienzan en febrero con la primera, la cual tiene una duración de 17 semanas de crecimiento y forma frutos con 22 mm de largo por 12,2 de ancho; a su vez la segunda fructificación se da a partir del 10 de agosto es decir al comienzo de la maduración de la primera como lo señalan las (Figuras 24 y 25) tardando el mismo tiempo en

comenzar su maduración con frutos de 21mm de largo y 15,8 de ancho; la tercera fructificación comienza el 16 de septiembre, dos semanas antes de iniciar la maduración anterior.

Figura 21Longitud y ancho genotipo de frutos 4B

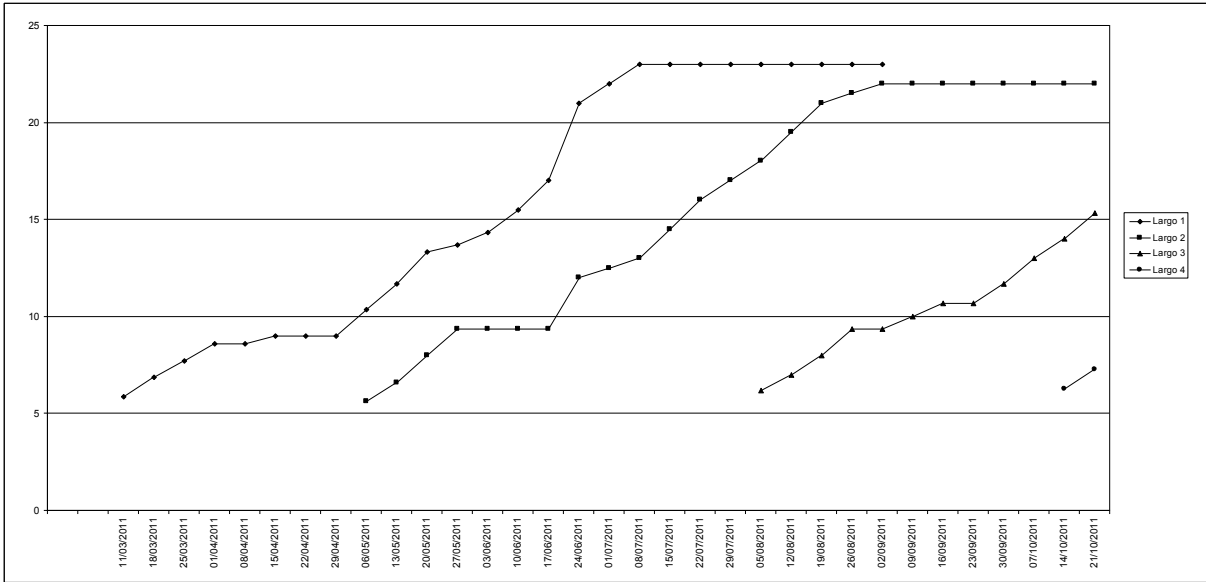


Figura 22 Longitud y ancho de frutos genotipo 4B

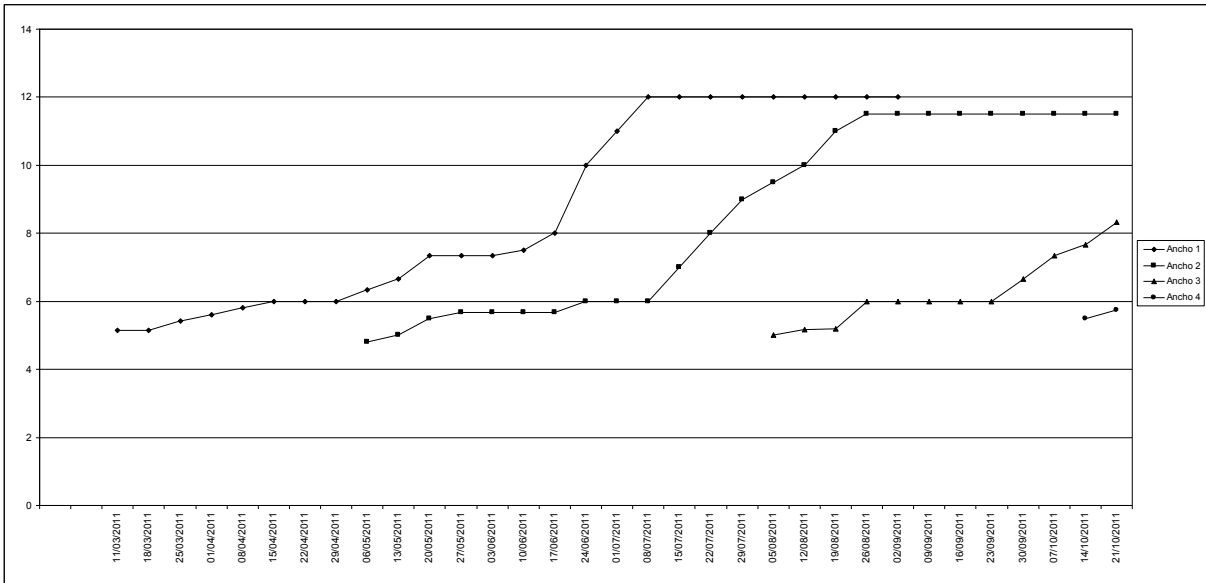


Figura 23 Longitud y ancho de frutos genotipo 5

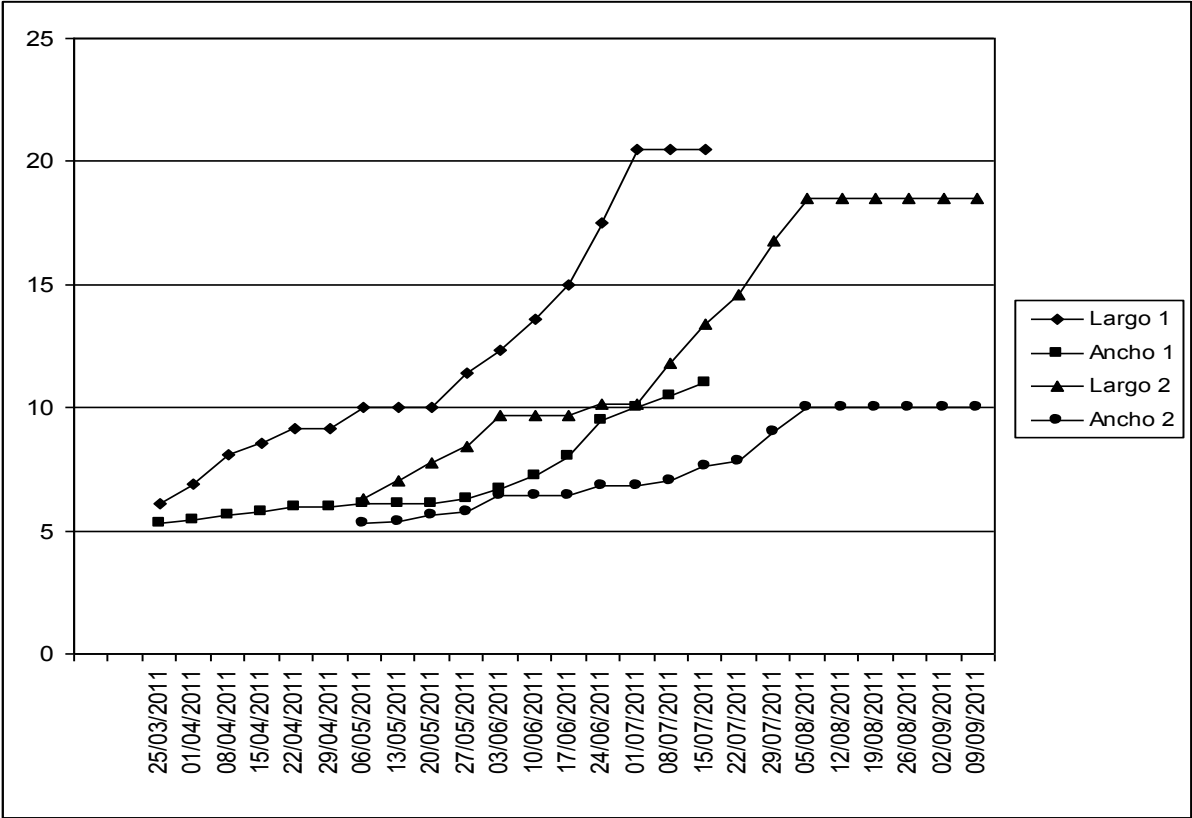


Figura 24 Longitud de frutos genotipo 6

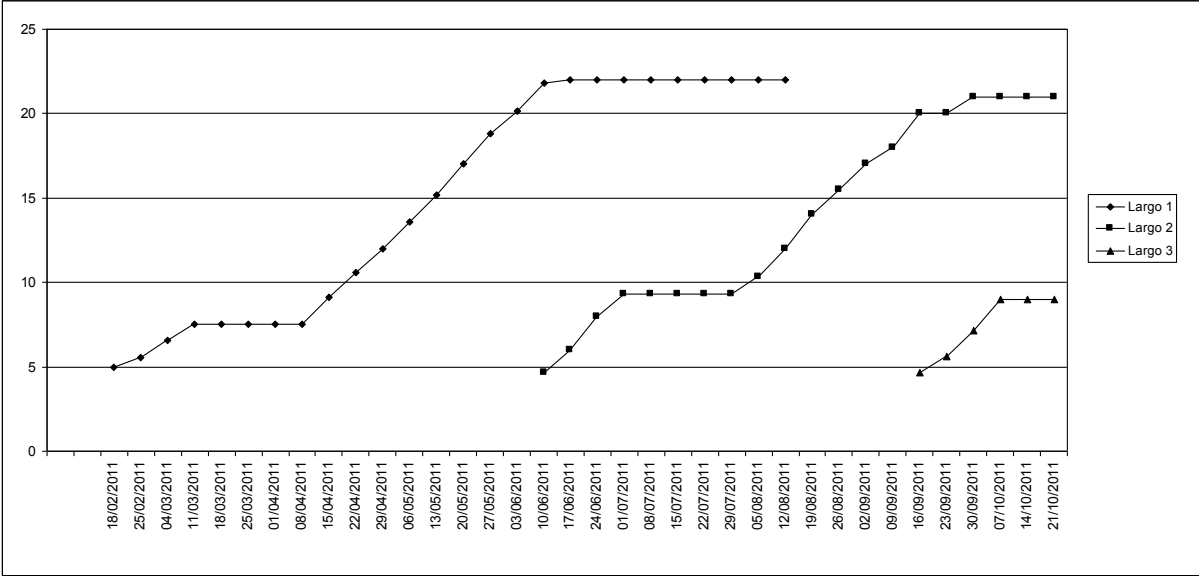
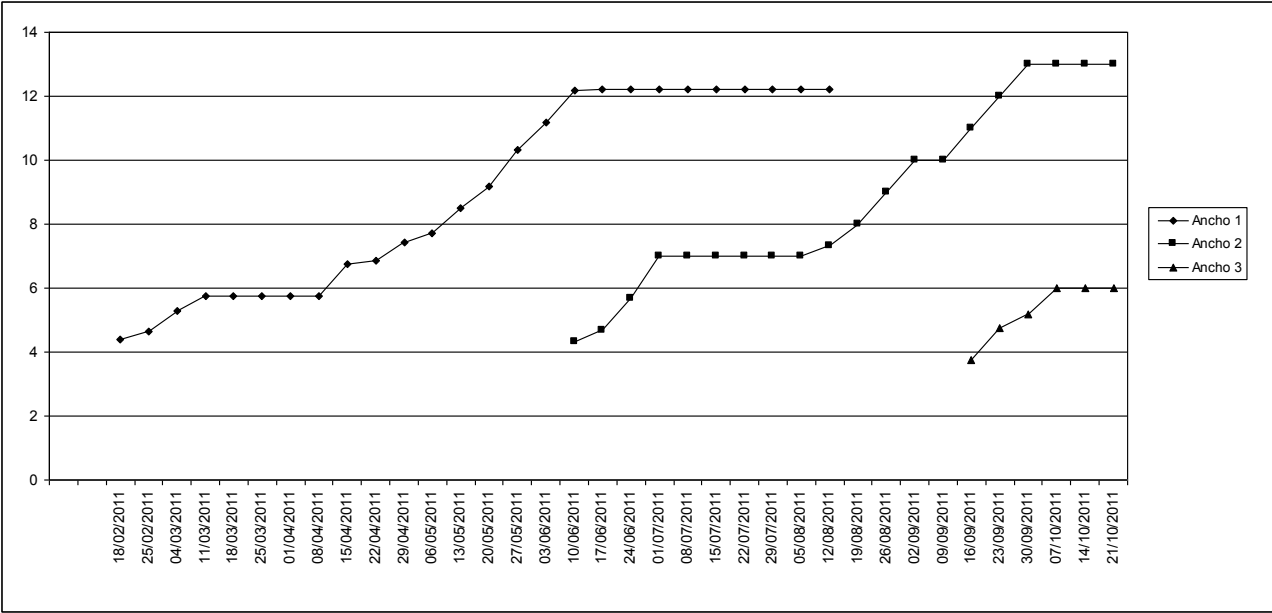
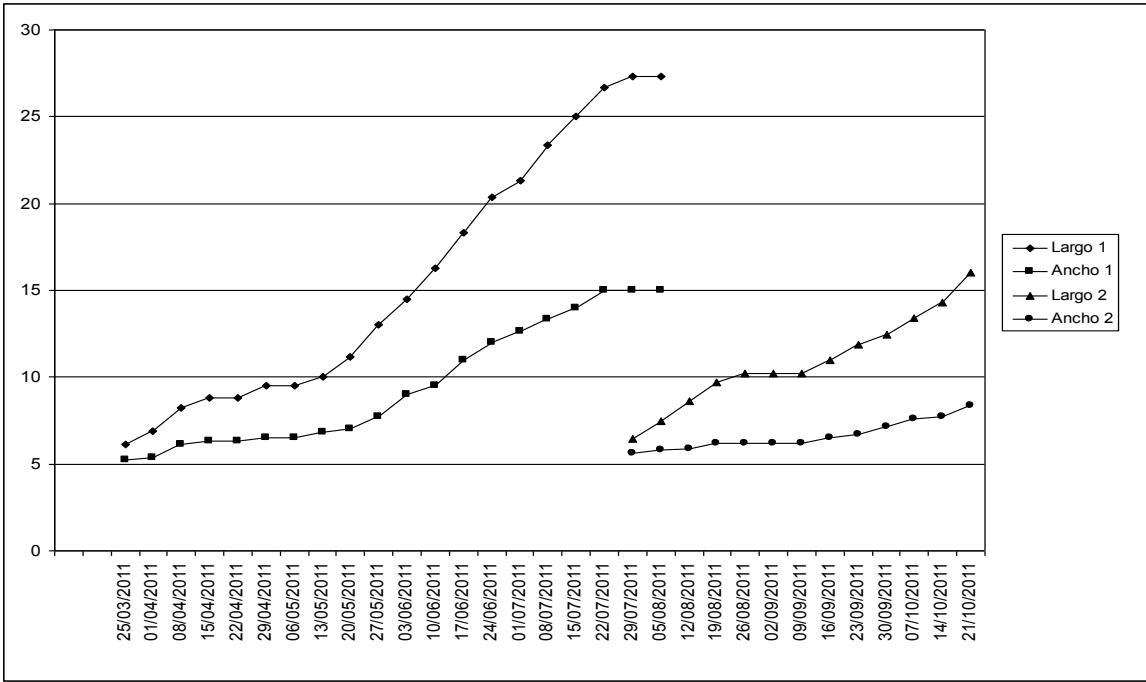


Figura 25 Ancho de frutos genotipo 6



El genotipo 10 tiene dos floraciones bien distanciadas, como se observa en la (Figura 26), la segunda inicia al comenzar la maduración de la primera, 18 semanas después; sin embargo se debe anotar que estos frutos se cayeron en ésta época. Los frutos alcanzaron un tamaño de 27,3 mm de largo por 15 de ancho.

Figura 26 Longitud y ancho de frutos genotipo 10



Las dos primeras fructificaciones de genotipo 1 y la dos únicas del 4A muestran que la maduración de sus frutos comienzan con una semana de diferencia, es decir la cosecha de estos frutos puede hacerse en la misma época. De otra parte la maduración de los genotipos 1, 3, 4A y 5 comienzan en la misma época entre el 5 y el 12 de agosto; así mismo la maduración de la primera fructificación del genotipo 4B tiene una semana de diferencia con la primera del genotipo 6 como se observa en las gráficas.

De acuerdo con los datos de Montali (2006) el crecimiento de los frutos tiene una duración aproximada de 98 días, donde comienza el cambio de color, que dura 115 días; los genotipos encontrados en Colombia crecieron entre 15 y 20 semanas, así por ejemplo para el genotipo 1 la primera fructificación termina su crecimiento a las 18 semanas mientras que la segunda lo hace en 17; en el caso del genotipo 3 este periodo es de 20 semanas, entre tanto que para el genotipo 4A en su primera fructificación el comienzo de la maduración es a las 22 semanas pero en la segunda ocurre a las 18. De otra parte el genotipo 4B el comienzo de la maduración de sus dos primeras fructificaciones de da a las 15 y 17 semanas respectivamente. Para el caso del árbol joven del genotipo 5 las fructificaciones terminan su crecimiento a las 16 y 15 semanas y para el genotipo 6 u árbol de 4 años el tiempo en iniciar la maduración es de 17 y 16 semanas, mientras que el árbol de más de 30 años identificado como genotipo 10 la primera fructificación finaliza su crecimiento a las 18 semanas, esto permite observar que no existe uniformidad para esta fase fenológica en ninguno de los tratamientos.

En el olivo se producen los crecimientos vegetativo y reproductor al mismo tiempo. Esta simultaneidad produce una serie de interacciones entre sumideros (brotes, frutos y yemas) que afectan la fructificación del árbol en todo su ciclo productivo Ramírez Santa Pau (2001). Y de acuerdo con Wright (1989) el orden de prioridad entre los sumideros es diferente siendo los más fuertes las semillas y posteriormente los frutos, ápices en crecimiento y hojas, cambium raíces y por ultimo madera para reserva.

De acuerdo con lo anterior se puede considerar que la disparidad en el crecimiento de los frutos para los genotipos encontrados en Colombia, está relacionado con la cantidad de estructuras vegetativas que tienen los arboles dado que a estos no se les realiza poda.

#### ***2.4. Crecimiento de ramas***

En el crecimiento vegetativo de los diferentes genotipos encontrados se aprecia una elongación permanente y uniforme (Figuras 27 a 33), donde la mayor longitud la tuvieron los genotipos de árboles nuevos 4A, 5 y 6 con un promedio de 94.5, 90.5 y 86mm respectivamente, mientras que en los demás

genotipos fue inferior así: el genotipo1 creció 70.2mm, el 3 tuvo una longitud de 80.9mm, 4B aumentó en 70.9mm y el genotipo 10 creció 71.2mm. En ningún caso se detuvo el crecimiento.

Respecto a la longitud y número de entrenudos por rama se observa que el promedio de estos es para el genotipo 1 (5.3), 3 (6), 4A (6.6), 4B (5), 5 (7.4), 6 (5,6) y 10 (4.5) entrenudos y la longitud de los mismos de: 13.2, 13.4, 14.3, 14.1, 12.2, 15.3 y 15.8 respectivamente; la mayor distancia la tienen los entrenudos cerca de la base de la rama donde se encuentran medidas en promedio de 20mm.

Los reportes de las gráficas deja ver que en los olivos del estudio no existe un crecimiento vegetativo similar al de las regiones olivareras del mundo, donde las ramas en un año crecen hasta 20 cm, aun considerando que en el estudio solo se midió el crecimiento durante 10 meses; además el Mediterráneo la poda estimula el crecimiento vegetativo. De otra parte se observó que algunas estructuras vegetativas detiene su crecimiento por una o dos semanas como lo muestran las gráficas, luego del cual emergen en el meristemo apical de 1 a 3 nuevas ramas que crecen con el mismo comportamiento de las anteriores; este estacionamiento puede estar relacionado con la presencia de frutos que obran como fuertes sumideros, si se considera que en el olivo en las condiciones del Mediterráneo un nivel de fructificación elevado reduce el crecimiento vegetativo.

*Figura 27 Crecimiento ramas genotipo 1*

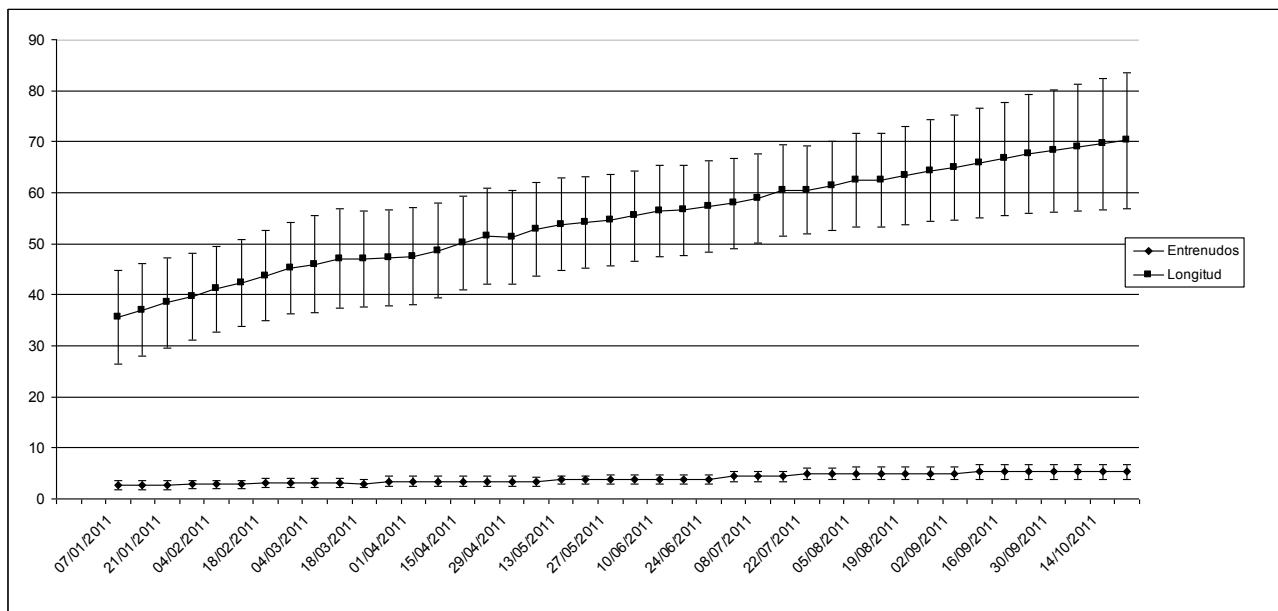


Figura 28 Crecimiento ramas genotipo 3

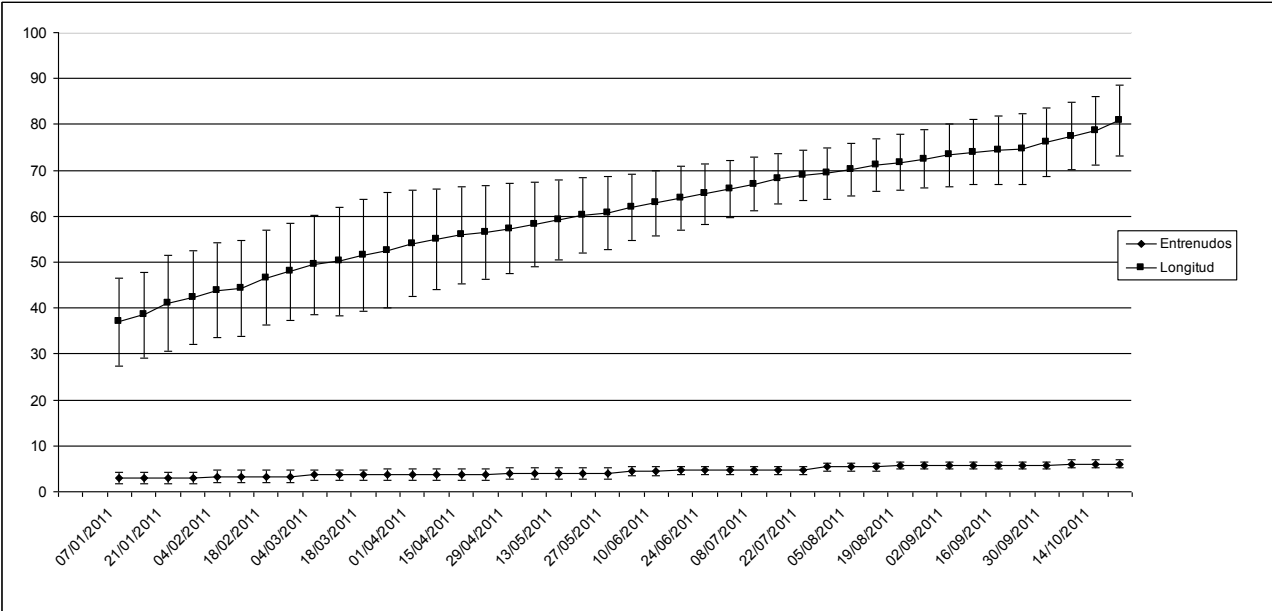


Figura 29 Crecimiento ramas genotipo 4A

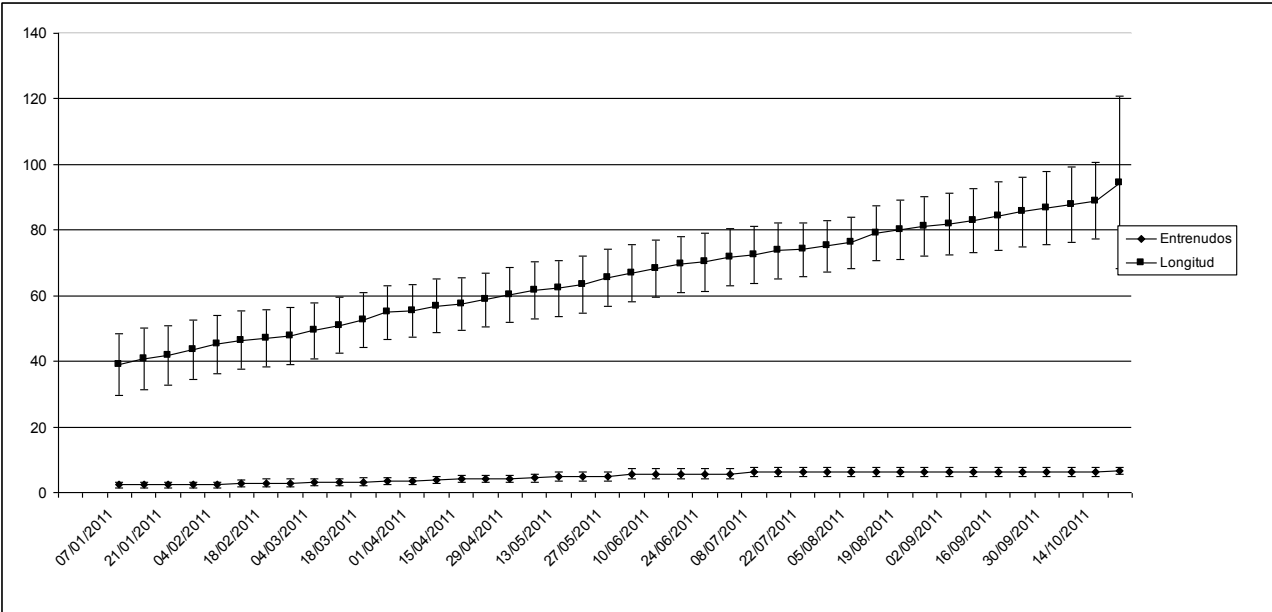


Figura 30 Crecimiento ramas genotipo 4B

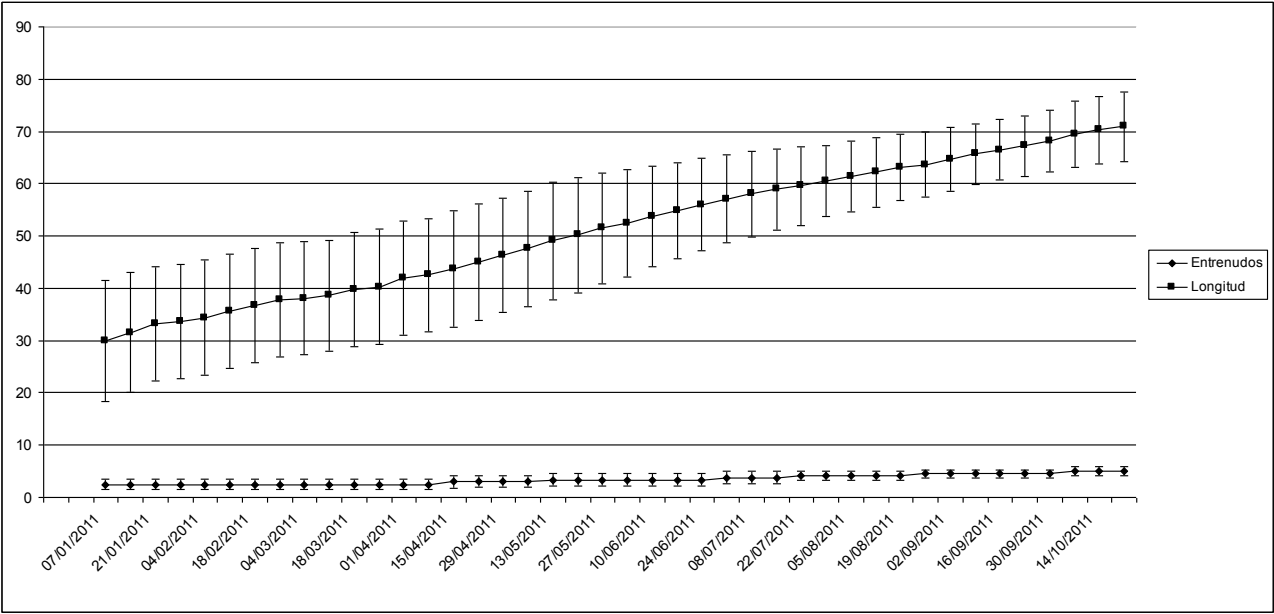


Figura 31 Crecimiento ramas genotipo 5

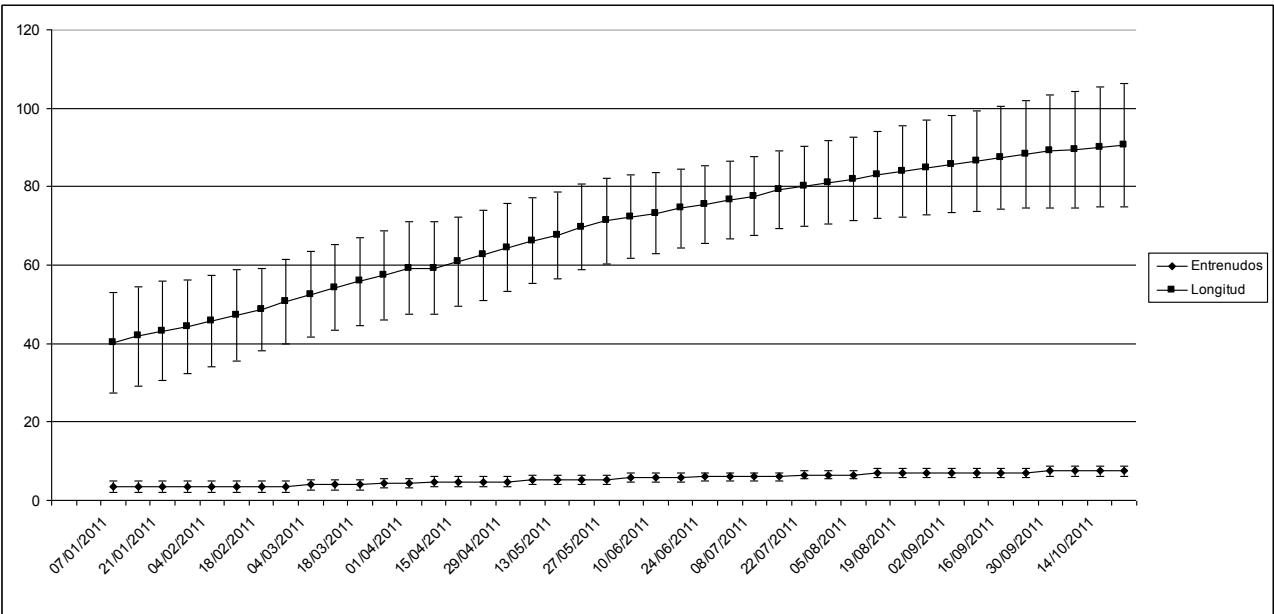




Figura 32 Crecimiento ramas genotipo 6

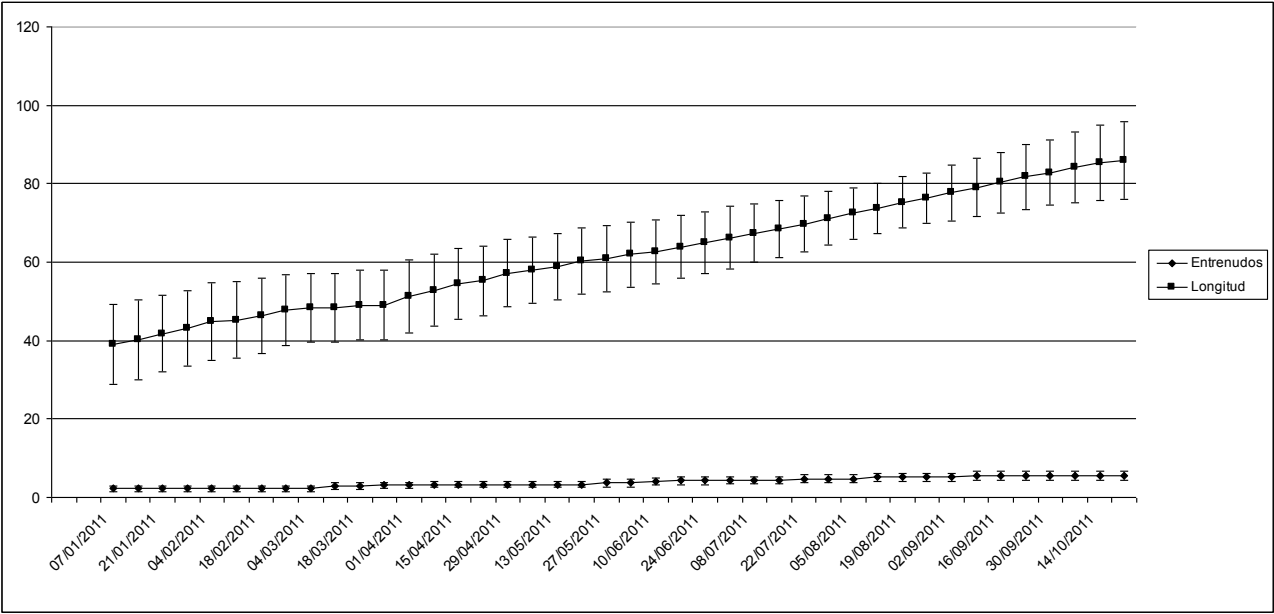
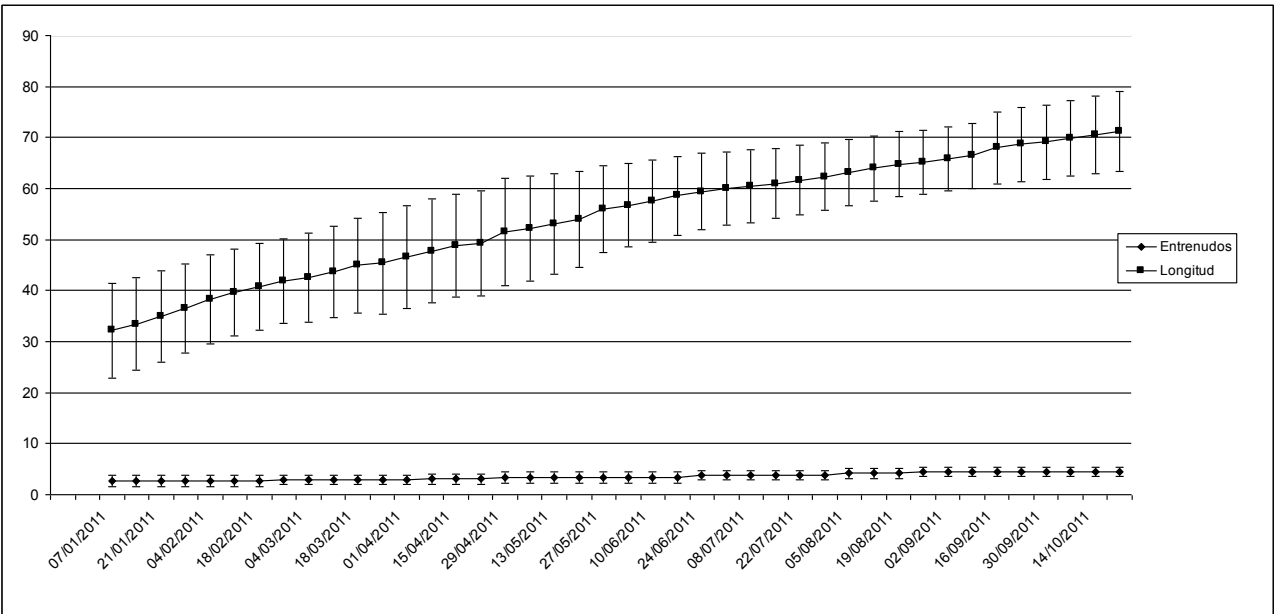


Figura 33 Crecimiento ramas genotipo 10



## **2.5. Condiciones ambientales, crecimiento y desarrollo**

El olivo es una especie de termoperiodo obligado. Hartmann y Porlingis (1957) citaron los requerimientos del olivo entre 800 y 1000 horas-frio (por debajo de 7°C) para la aparición de los primordios florales, considerando las bajas temperaturas como un factor inductor de la floración, siendo algunas variedades más exigentes que otras, como por ejemplo Ascolano, Selvillano, Manzanillo, Barouni, Ciolla y Misión requieren 1600 horas-frio, mientras que Nocellara del Belice ha mostrado necesidad de frio de 400 horas inferior a 9°C.

De otra parte Hackett y Hartmann (1967) confirman que la floración es inhibida por temperaturas constantes de 18°C y 4°C, mientras que las temperaturas constantes de 10°C y 13°C la promueven. En 1975 Hartmann y Whisler obtuvieron una producción óptima de inflorescencias exponiendo por 70 a 80 días a un modelo de variación de temperatura con un mínimo de 2°C y un máximo de 15°C. Aunque una temperatura constante de 12,5°C promueve la formación de flores, mientras que temperaturas continuamente bajas (7°C) o continuamente altas (15°C) no determinan la formación de inflorescencias (Tombesi 2003).

Cimato y Fiorino (1986) sostienen que las temperaturas bajas afectan a la inducción solo en árboles en el año de carga, mientras que los árboles en descarga se muestran independientes a la acción del frio. Sin embargo para Fabbri y Alerci (1999), la floración potencial queda establecida en verano y la floración efectiva en la primavera siguiente y será inducida durante el otoño.

Los olivos en el trópico Alto Andino no experimentan estos cambios dado que el comportamiento del clima de acuerdo con los datos registrados en la estación climatología ubicada en la región indican las temperaturas más bajas ocurren en la noche con valores promedio que oscilan entre 6,5°C en los meses de diciembre enero y 9,2°C abril mayo distribuyéndose además en dos temporadas de temperaturas nocturnas de 6,5 a 7,4 C en los meses de diciembre a febrero y entre 7,6 a 7,9C los meses de julio agosto septiembre ; en consecuencia no existe una acumulación de horas frio de acuerdo con los argumentos de Hartmann y Porlingis.

Esto hace suponer que la inducción floral en los olivos de esta región se puede producir por causas diferentes a la acumulación de horas-frio y puede deberse a cambios en el equilibrio hormonal, cambios en el meristemo debido a un debilitamiento temporal de la dominancia apical, cambio en la distribución de nutrientes en el meristemo apical o expresión de los genes responsables del desarrollo de la yema floral que normalmente están reprimidos Ramírez Santa Pau (2001), lo que influye en las distintas épocas de floración.

De otra parte las máximas temperaturas en esta región ocurren en el día con valores promedio entre 25 y 27°C, temperatura a la cual se da la mayor tasa fotosintética del olivo (Gucci 2003; Barranco et al., 2008), si los diferentes factores le son favorables, eso significa que los arboles realizan fotosíntesis durante todo el año dada su condición siempre verde; del mismo modo tiene posibilidad de hacerla

más tempo diario dado que el fotoperiodo en el trópico es relativamente constante, no obstante que el olivo se considera una especie de día neutro Ramírez Santa Pau (2001).

La actividad fotosintética en el olivo la realiza desde los 5°C, aun cuando disminuye la cantidad de asimilados producidas en las hojas, pero el periodo limitante de la temperatura sobre la fotosíntesis puede darse en condiciones más extremas, que en la región del Alto Ricaurte no son frecuentes.

Las floraciones en los olivos de la región en estudio, se distribuyan en los dos semestres de año, como se observa en las gráficas, esto coincide con los dos periodos de precipitación que van de marzo a mayo y octubre diciembre, con promedio anual de 950 mm de acuerdo al registro de esta variable durante los últimos 20 años, realizados por el IDEAM ; considerando que el olivo es una planta se cultiva en regiones donde el principal factor de limitante es el agua en la región en estudio esta situación no es limitante, sin embargo son numerosos las adaptaciones morfológicas que permiten al olivo resistir una reducida disponibilidad hídrica en el sustrato (Gucci et al., 2003).

## ***2.6. Condición edáficas, crecimiento y desarrollo***

El olivo es una planta que se adapta a condiciones adversas de suelo, sin embargo, la fenología; inducción, diferenciación floral, fotosíntesis, cuajado de frutos y maduración depende además de otros factores de la condición física, química y biológica del suelo. Esta planta requiere para su normal desarrollo de los 16 elementos que forman parte de la nutrición vegetal, aunque son diferentes las necesidades de árboles adultos y jóvenes, así como del estado fenológico en que se encuentren, pero en general el olivo requiere principalmente de N, K, P, Ca, Mg, S y B. Al respecto los suelos de los cultivos de olivos en la zona de estudio no están aportando los nutrientes que la planta requiere como lo demuestran los análisis de suelo de las fincas escogidas (Tabla 7). En esta además se observa que la disponibilidad de N es muy baja, así como la del P y del K fundamentales en el crecimiento del olivo.

En el caso del N, los datos reportados indican que en la F1 en N total es de 0.015%, F2 de 0,102%, es el tratamiento con más contenido, en F3 y F4 0,077 y 0,082 % (Tabla 7) respectivamente, situación que se refleja en el bajo crecimiento de las ramas, aún más si se considera que las plantas no tienen poda en ningún caso y el N aportado por el agua de lluvia o por la mineralización de la materia orgánica lo emplean en el crecimiento vegetativo. Sin embargo las extracciones de este elemento son bajas 3-4 g de N/kg de aceituna como máximo García Novelo (2006); varios investigadores han encontrado que aplicaciones de N no provocan ninguna respuesta en el olivo y que únicamente se debe aplicar cuando la concentración en hojas indique una situación de deficiencia García Novelo et al., (2002); la situación de deficiencia se manifiesta por una pérdida generalizada de clorofila que da lugar a una clorosis inespecífica en el limbo Fernández- Escobar et al., (1994).

Para el caso del K, los valores del suelo de cada finca son: 0.13, 0.29, 0.28 y 0.35 meq.100g de suelo respectivamente como se observa en la (Tabla 7) un valor considerado bajo para el cultivo del olivo dado que es el elemento que en mayor cantidad extrae el cultivo, del orden de 4,5 g K/kg de aceituna y de acuerdo con Fernández-Escobar et al. (2005); la deficiencia de este elemento muestra necrosis apicales o laterales en hojas y defoliación de ramas nuevas, especialmente cuando hay baja humedad en el suelo que limita la difusión del ión ( $K^+$ ) en la disolución del suelo e impide su absorción por las raíces; aunque esta deficiencia puede confundirse con la de B, que en los análisis resulta también bajo (Tabla 7) para los requerimientos del olivo. La situación mencionada anteriormente está ocurriendo en las plantas en estudio, donde se pudo apreciar la necrosis de las hojas y la caída de las mismas en las ramas del año.

Finca	Tex.	pH	% MO	% N <sub>T</sub>	P ppm	Meq. 100 g de suelo- cmol+Kg+1						Elementos menores (ppm)					%		C.E. ds/m
						Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Al	Na	
F1	F.Ar.	4.6	0.31	0,015	6.08	1.4	5.71	4.39	0.13	0.08	11.71	7.08	1.09	0.63	1.85	0.06	11.9	068	1.52
F2	A.	7.6	2.05	0,102	22.6	0.0	30.2	0.31	0.29	0.12	30.92	6.18	0.84	3.43	17.8	0.06	-	039	0.38
F3	F.Ar	5.2	1.54	0,077	6.86	0.2	9.39	1.51	0.28	0.11	11.49	44.5	3.14	0.53	6.06	6.06	1.74	.96	1.99

*Tabla 7 Composición química del suelo de cada una de las fincas donde están los cultivos de olivos.*

El fósforo es uno de los elementos importantes en la fertilización de cultivos anuales, pero en el caso de cultivos perennes y leñosos su importancia relativa disminuye por la facilidad de reutilización a bajas concentraciones, que en el caso del olivo resultan en torno a 0,7 g P/kg de aceituna. Sin embargo para el caso de las plantas en estudio el elemento que se encuentra en niveles bajos para las fincas 1,3 y 6 ppm (Tabla 7) y medio para la finca 2 no está siendo disponible a causa del pH y la presencia de  $Al^{3+}$  intercambiable para la finca 1. Lo que se refleja en el crecimiento reducido de las ramas, la disparidad en el cuajado del fruto y demora en la maduración.

De otra parte la CICE cuyos valores muestra la (tabla 7) son bajos para los suelos de las fincas 1 y 3, muy bajo para la finca 6 y alto para la finca 2 debido a que es un suelo arcilloso y con el más alto contenido de materia orgánica 2,05 no permiten un aprovechamiento máximo de los elementos presentes en el terreno para sostener el cultivo, debido igualmente al pH que inhibe la toma de la mayoría de los elementos, situación reflejada en el poco crecimiento de las ramas y la poca presencia de flores en los diferentes periodos corridos.

Respecto a la materia orgánica en estos suelos el porcentaje es bajo, siendo la finca 1 la de menor contenido 0,31% y la finca 2 la del más alto 2,05 igualmente escaso (Tabla 7) en las fincas 3 y 6 el porcentaje es de 1,54 y 1,64 % respectivamente. Situación por la cual el nitrógeno es igualmente bajo; Sin embargo el olivo produce con un valor de sustancia orgánica bajo (hasta con menos del 1%) en este caso las plantas deben ser bien nutridas para garantizar una buena producción teniendo en cuenta que están en un ecosistema frágil Rotundo et al.,(2003) y la sustancia orgánica favorece la condición física del suelo, regula el pH, la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), mantiene los nutrientes de forma disponible así como los microorganismos del suelo que solubilizan o mineralizan algunos nutrientes como el fósforo y el nitrógeno.

La Tabla 8 muestra las relaciones catiónicas de las bases intercambiables que ocurren en los suelos de las fincas donde se encuentran los olivos, donde se observa que existe descompensación entre estos cationes lo que genera dificultad en la absorción de alguno de ellos aun cuando están presentes en el suelo, así por ejemplo en la finca 1 el Mg se encuentra en muy alta cantidad respecto al K, provocando caída de hojas en ramas del año por deficiencia de este último como lo señala Fernández-Escobar; pero respecto al calcio la relación es baja (1.3) provocando su deficiencia lo que se puede reflejar en la consistencia de

la pulpa en la aceituna que allí solo se emplea para consumo como fruto. De otra parte Ca/K es muy alta impidiendo igualmente la absorción de K.

La Ca/Mg es muy alta en la finca 2 que reporto excesivo contenido de Ca 30.2 meq./100g de suelo (Tabla 7) y alta en las fincas 3 y 6 generando deficiencia de Mg lo que contribuye con la caída de las hojas, además la deficiencia en potasio en las tres fincas está ocurriendo por la mayor cantidad de Ca respecto al potasio (Tabla 7). La Mg/K igualmente es alta en los tres casos provocando deficiencia de K.

*Tabla 8 Relaciones catiónicas*

Muestra	Relaciones catiónicas (meq/100g-cmol.Kg <sup>-1</sup> )				
	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	K/Mg	(Ca+Mg/K)
Finca 1	1.3	43.9	33.8	0.03	77.7
Finca 2	127.6	104.1	1.07	0.93	105,0
Finca 3	6.22	33.5	5.39	0.18	38.9
Finca 6	4.47	9.2	2.06	0.48	11.2
Valores de referencia	<b>3-5</b>	<b>12-18</b>	<b>6-8</b>	<b>0.2-0.3</b>	<b>12-20</b>

Finalmente para la finca la relación de K respecto al Mg es baja mientras que para las demás es alta respecto a los valores de referencia como se aprecia en la (Tabla 8). De acuerdo con (Rotundo et al., 2003) para cualquier elemento nutritivo es posible establecer el balance de disponibilidad para el cultivo, en relación a la movilidad del elemento en el suelo, pues una descompensación provoca deficiencias que afectan es desarrollo y crecimiento de las plantas.





## V. CONCLUSIONES

La olivicultura en Colombia que empieza a desarrollarse en la región del Alto Ricaurte ofrece la posibilidad de un desarrollo económico, especialmente en fincas de minifundio, del mismo modo este cultivar resulta ser una alternativa para la construcción de capa arable ayudando a detener la erosión, además ofrece la posibilidad de embellecer el entorno por las características mismas del árbol, razones que justifican la investigación realizada como un estudio preliminar para el desarrollo de una olivicultura en altitud.

El análisis molecular permito identificar 10 genotipos del material existente en la región revelando que no son las variedades que identifican los cultivadores. De otra parte, de los genotipos encontrados ninguno corresponde a los que se encuentran en el banco de datos del departamento de biología vegetal de la Universidad de Parma: italianos, españoles y franceses, por esta razón se debe buscar en otros bancos de datos principalmente españoles, para corroborar a que variedades corresponde el material vegetal que existe en Colombia.

La floración se presenta en diferentes periodos de los cuales en algunos casos se concentra en dos meses independientemente de ser arboles nuevos o viejos, mientras que en otros se distancia una de otra hasta en 8 semanas; igualmente la duración individual de cada floración es diferente porque en algunos casos dura 4 semanas mientras que en otros son 6; los factores que están incidiendo pueden ser: falta de poda que provoca exceso de ramas vegetativas, baja fertilidad del suelo que impide al árbol tener un balance nutricional generándole desordenes fisiológicos, poca acumulación de horas frio para lograr la diferenciación floral y permanente actividad fotosintética que impide la sincronización del árbol.

La maduración de los frutos esta distribuida durante todo el año, igualmente presenta alteraciones en el tiempo para cada genotipo y en las mismas plantas, lo que puede estar atribuido a las mismas razones que afectan la floración, pero principalmente a que los

nutrientes en el suelo, no son disponibles debido a la descompensación de los mismos en el suelo; en muchos casos los frutos se cayeron antes y después de comenzar la maduración, lo que debe ser por la caída normal en la planta pero dada la poca cantidad de aceitunas eso puede atribuirse a una falta de nutrientes para mantener a estos frutos, además porque en muchos casos también se cayeron hojas.

El crecimiento de las ramas se muestra en menor longitud que en las regiones olivareras del mediterráneo, pues mientras aquí crecen en promedio 20cm en el trópico solo llegan a un máximo de 10cm, sin embargo se debe tener presente que las ramas detuvieron su crecimiento por una o dos semanas luego de las cuales aparecieron hasta tres nuevos brotes en el meristemo apical que crecieron y en algunos casos tuvieron floración.

Se requieren nuevos estudios para determinar con exactitud la fenología de los diferentes genotipos encontrados, pero realizando en ellos las prácticas agronómicas correspondientes teniendo presente que los estudios para crecimiento y desarrollo se deben llevar a cabo durante tres años, sin embargo este estudio preliminar delimita los trabajos solos aquellos arboles identificados genéticamente.

Se necesita establecer un campo colección para estudiar nuevas variedades posibles de plantar en Colombia y realizar una completa identificación de las variedades de mejor comportamiento en las condiciones del Trópico Alto Andino, considerando otras variables no evaluadas en este estudio.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Bargioni, G. 2006. L'olivo e la sua coltivazione. L'Informatore Agrario. Verona Italia. 156p.
- Barone, E. Di Marco, L. 2003. Capítulo 2: Morfologia e ciclo di sviluppo. Pp 13-33. Fiorino P. Trattato di olivicoltura. Edagricole. Bologna, 461p.
- Barranco D. Fernández-Escobar R. Rallo L., 2008, El cultivo del olivo, sexta edición, Ediciones Mundi –Prensa Madrid, 846p.
- Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I., 2004a Optimal use of RADP markers for identifying varieties in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129(2): 266-270.
- Bellini E., Giordani E., Nin S., 2003. Genetica e miglioramento Pp 113-143. Fiorino P. Trattato di olivicoltura. Edagricole. Bologna, 461p.
- Bravo M., Gómez P., Kaen R., Montalban D., Ovejero D., Andrada C., 2004. Determinación de la época de estabilización de nitrógeno, fosforo y potasio foliar en olivos, del valle central de la provincia de Catamarca. Rev. Del Cizas vol 5, nº 1-2 pp 81-90.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., and Giorgio G., 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). Theor. Appl. Genet. 104:301-307.
- Cavagnaro, P., Juárez J., Bauza M., Masuelli R 2001 Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares Agriscientia XVIII: 27-35.
- Cimato A., Fiorino P., 1986. Influence of fruit bearing on flower induction and differentiation in olive *Olea*. Vol. 17 pp 55-60.
- Cortez A., 2010 (Converaciones personales-CON.PER).
- Deidda, P., Nieddu, G., Chessa, I. 2003. Capítulo 4: La Fenologia. Pp 57-73. Fiorino P. Trattato di olivicoltura. Edagricole. Bologna, 461p.

- Díaz Bermúdez A., 2005. Desarrollo caracterización de nuevos microsatélites y SNPs y amplificación en la mejora genética del olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Universidad de Córdoba – E.T.S.I.A.M. Córdoba.
- Donoso J., Bastias R., Lemus G., Silva L., 2007 Comportamiento fenológico del olivo (*Olea europaea* L.) en tres localidades de la VI región, temporada 2005-2006. INIA Chile.
- Durante M., Petruccelli R., Bartolini G., Bernardi R., 1992. Impiego delle proteine di riserva per l'identificazione delle cultivar di olivo (*Olea europaea* L.). Cong. "Olive olio qualità". 57p p.
- Fabbri A., 2006. L'olivo nella storia dell'agricoltura dell'Italia settentrionale (Comunicazione presentata al convegno dell'Accademia dei Georgofili "L'olio di oliva nel Nord Est", Padova, 17 maggio 2006) Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale Università di Parma
- Fabbri, A. y Benelli, C. 2000 Flower bud induction and differentiation in olive. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 75(2): 131-141
- Fabbri A., Alerci L., 1999. Anatomical aspects of flower and leaf bud differentiation in *Olea europaea* L. Acta Hort. Vol. 447: 245-249.
- Fabbri, A. y Alerci, L. 1999 Reproductive and vegetative bud differentiation in *Olea europaea* L. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 74(4): 522-527
- Fernández-Escobar R., Benlloch M., Navarro C., Martín G., 1992 The time of floral induction in the olive. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110(2): 303-309.
- Fernández-Escobar R., García Barragán T., Benlloch M., 1994. Estado nutritivo de las plantaciones de olivar en la provincia de Granada. ITEA, 90:39-49.
- Gallitelli M., Semeraro L., Antonelli N. M., 1991. Analysis in the olive (*Olea europaea* L.), EMBO COURSE, Cologne.
- Ganino T., 2006. Indagini morfologiche e biomolecolari per la caratterizzazione di genotipi emiliani di *Olea europaea* L. Tesis Doctoral, Dipartimento de Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma.
- García Novelo J., 2006. El balance del nitrógeno en el olivar. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. 285 pp.
- García Novelo J., Sánchez-Zamora M., Marín L., Fernández-Escobar R., 2002. Optimización del abonado nitrogenado en el olivar. Comunicaciones al IX Simposio Ibérico sobre nutrición mineral de plantas, Zaragoza, pp. 267-269.

- García, F. 1963 Antecedentes, ensayos, diseño experimental, trabajos realizados, perspectivas económicas del cultivo del olivo en nuestro medio. Instituto de fomento algodonero división oleaginosas perennes
- Gómez del Campo M., Rapoport H., 2008 [ de la yema al desarrollo inicial de la aceituna ] Descripción de la iniciación floral, floración, cuajado, caída de frutos y endurecimiento del hueso. Dossier agricultura. Pp 400-406.
- Gottlieb L. D., 1981 Electrophoretic evidence and plant populations. Progress Phytochem, 7:1 – 46.
- Gounaris Y., Skuola M., Fournaraki C., Drakakaki G., Makris A., 2002. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum x intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. Biochemical Systematics and Ecology, 30: 249-258.
- Gucci R. Londolini E. Rapoport H., 2009, Water deficit-induced changes in mesocarp cellular processes and the relationship between mesocarp and endocarp during olive fruit development. Tree Physiology. Oxford journals. Vol. 29 Pp 1575-1585
- .
- Gucci, R. 2003. Capítulo 5: Ecofisiología. Pp77-89. Fiorino P. Trattato di olivicoltura. Edagricole. Bologna, 461p.
- Gucci, R. 2003<sup>a</sup>. Capítulo 6: Resistenza Agli Stress Ambientali. Pp 91-111. Fiorino P. Trattato di olivicoltura. Edagricole. Bologna, 461p.
- Gutiérrez G., 2007 Diagnóstico del cultivo de olivo en la región Arequipa Perú. Competitividad Innovación Desarrollo. 103p.
- Hackett W., Hartmann H., 1967. The influence of temperature on floral initiation in the olive. Physiol. 20, 430 p.
- Hartmann H., Whisler J., 1975. Flower production in olives as influenced by various chilling temperatures regimens. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (6), 670-4.
- Hartmann H., Porlingis I., 1957 Effects of different amounts of winter chileing on fruitfulness of several olive varieties. Bot. Gaz. Vol. 119, 102-104.
- Lavee S., Rallo I., Ramos A., 1996. Efecto de la defoliación, de la carga del árbol y de la acumulación de frío en la brotación forzada de yemas de estacas de olivo .Actas de horticultura vol. 15 pp. 97-102.
- Lincoln T. Zeiger E. 2008, Fisiologia Vegetale, tercera edición, Piccin Padova, 1014p.

- Marrazzo T., Cipriani G., Marconi R., Cimato A., Testolin R., 2002. Isolation and characterisation of microsatellite AND in olive (*Olea europaea* L.). Acta Hort. 586: 61-64.
- Montali L., 2006 Studio sull'abscissione in fiori e frutti di (*Olea europea* L.) cv leccino. Tesi di laurea, Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma.
- Mora F., Rodovalho M., Deitos A., Aatorga M., 2007. Estratégias Fundamentais para o Desenvolvimento da Cultura da Oliveira no Brasil Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas V.1, n. 1, p. 66.
- Morettini A., 1972. Olivicoltura. Ed. Reda, Roma.
- Mormeneo I., 2008. Horas de frío y sumas térmicas en la predicción del inicio de la etapa reproductiva en plantas de olivo *Olea europaea* L. Rev. Departamento de agronomía UNS 9(1-2): 1-10.
- Rache L. Rojas E y Pacheco J. 2008. Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento in vitro de microinjertos. Bioagro 20 (1): 56 -65
- Ramirez Santa Pau M., 2001. Variabilidad de la producción en olivo (*Olea europaea* L.) relación entre la alternancia, floración, vigor y productividad. Tesis doctoral, Departamento de agronomía, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes Universidad de Córdoba
- Rotundo A., Lombardo N., Marone E., Fiorino P., 2003. Capítulo 18: La nutrizione minerale e le concimazioni. Pp 331-389. Fiorino P. Trattato di olivicultura. Edagricole. Bologna, 461p.
- Rubio G., Rallo L., Rapoport H. 2007. Crecimiento de brotes y yemas fructíferas de Olivo XI Congreso SECH Albacete Actas de horticultura nº 48
- Sáenz C., Gutiérrez M., Sanchez-Mateos V., 2003. Fenología, Aerobiología, y producción del olivar en Almodovar de Campo (Castilla de la Mancha) Anales jardín botánico de Madrid.
- Sefc K.M., López M.S., Mendonca D., Rodriguez Dos Santos M., Laimer Da Câmara Machado M., and Da Câmara Machado A., 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive tree. Mol. Ecol. 9:1171-1173.
- Soleri D. Koehmstedt A. Aradhya M.K. Polito V. Pinney K. (2010), Comparing the historic olive trees (*Olea europea* L.) of Santa Cruz Island with contemporaneous trees in the Santa

- Barbara, CA area: a case study of diversity and structure in an introduced agricultural species conserved *in situ*. Genet Resour Crop Evol. 57: 973-984.
- Sotomayor E., (2002) Evaluación de la maduración y calidad de cultivares de olivo en el valle de Azapa. IDESIA (Chile) Vol 20 N°1
- Taguas, F. 2009. El cultivo del olivo en el departamento de Boyacá –diagnóstico y plan de acción-. Ediciones cisnecolor. Bogotá. 83p.
- Taguas, F. 2010. (Conversaciones personales-COMPER)
- Tombesi, A. 2003. Capítulo 3: Biologia Fiorale e di Fruttificazione. Pp 35-55 Fiorino P. Trattato di olivicoltura. Edagricole. Bologna, 461p.
- Tombesi A., 1995. Fisiologia dell'olivo, tecniche colturali e loro interazione. Frutticoltura, 12, 15-21





## **Agradecimientos**

*Son muchas las personas a quienes debo agradecer tanto de la Universidad de Parma en Italia como de la Juan de Castellanos en Colombia.*

*Al Dr. Alessandro Bernazzoli Jefe de Relaciones Internacionales de la Universidad de Parma, quien motivo a las directivas para el apoyo económico, logístico y científico.*

*Loredana Gianolini por su pronta y eficiente gestión para el desplazamiento y permanencia en Italia.*

*Profesor Andrea Fabbri por el interés permanente en desarrollar un proyecto de investigación en olivos en Colombia, por el aporte de sus invaluable conocimientos y decidida colaboración con el proyecto de olivos en mi país.*

*Tommaso Ganino quien siempre estuvo pendiente de mi trabajo, resolviendo preguntas, aclarando dudas, orientando cada actividad aun en la distancia, buscando la mejor forma de realizar el trabajo, disponiendo muchas veces de su tiempo libre.*

*Deborah Begueh por su decidida colaboración, paciencia y tiempo dedicado en el trabajo del laboratorio así como en la búsqueda de información.*

*Annalisa Silvanini por su desinteresada colaboración con mi trabajo y estadía en Parma.*

*En la Fundación Universitaria Juan de Castellanos JDC:*

*Al Padre Luis Enrique Pérez Ojeda rector de la Fundación por el apoyo confianza y materialización del proyecto de doctorado.*

*Al Padre Oswaldo Martínez Mendoza vicerrector académico por su colaboración y apoyo para realizar el doctorado.*

*Al padre Fabio Ademar Gómez Sierra director del Instituto de Investigaciones Científicas INICIEN de la JDC, la persona que concibió la idea de realizar un doctorado en Italia para promover la olivicultura en Colombia, realizó la gestión con la Universidad de Parma y motivo a las directivas de ambas Instituciones para el desarrollo del doctorado.*

*Aracely Burgos y Andrea Cipamocha las personas que detrás de bambalinas me apoyaron.*

*A Pablo Santamaría, Giovanni Moreno y Yesid González compañeros de viaje y estadía en Italia, quienes fueron un gran apoyo durante el doctorado.*

*A los olivicultores:*

*Antonio Cortez principal promotor de la olivicultura en la región del Alto Ricaurte en Boyacá, quien facilito el trabajo de campo y suministro la información de la cual partió el proyecto.*

*Antonio Villamil quien permitió sin reparos el trabajo en su cultivo.*

*Cesar García un escultor enamorado de los olivos quien estuvo pendiente en todo momento del trabajo de campo, de los avances del proyecto y facilito el trabajo en sus olivos.*

*A los integrantes del grupo de investigación en abonos orgánicos fermentados:*

*Nubia Zoraida Plazas por su desinteresada colaboración y apoyo incondicional.*

*Yohana Romero, Pilar Gil y Claudia Ruiz quienes a pesar de sus ocupaciones siempre estuvieron dispuestos a colaborar con la recolección de información en campo.*

*Rosalba Rodríguez, Patricia Barrera, Zonia Barón, Carlos Castillo y Raúl Castellanos con quienes se desarrolló el trabajo de campo, sistematización de la información y ahora desarrollan sus trabajos de grado buscando más información sobre el comportamiento del olivo en la región.*

*Leonardo Ruiz quien me acompañó un tiempo en el laboratorio en Parma.*

*Luz Stella Jaramillo por su apoyo y colaboración desinteresada en la sistematización de los datos, diagramación de gráficas, búsqueda de información y trabajo de campo.*

*A mi familia:*

*Luis Jaime y Georgina mis padres, Jaime Heraclio, Rafael Eduardo, Oscar, Luis Fernando, Martha Cecilia, Olga Judith y María Cristina quienes siempre estuvieron atentos, dispuestos a colaborar y pendientes de mi familia en Colombia.*

*Antonio Mancipe, Alfonso y Yaneth Rodríguez mis cuñados por su colaboración con mi familia en mi ausencia.*

*Finalmente a las personas a quienes dedico este trabajo Esperanza mi esposa por su preocupación, entrega servicio, colaboración, compromiso y apoyo permanente lo que hizo posible que esta tarea se llevara a cabo.*

*María Fernanda y Adriana Judith nuestras dos adorables hijas que me motivaron y apoyaron en todo momento, aun sabiendo lo que significa estar lejos de ellas.*